

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-325076

(P2000-325076A)

(43)公開日 平成12年11月28日 (2000.11.28)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコ-ト <sup>*</sup> (参考)
C 12 N 5/06		C 12 N 5/00	E 4 B 0 2 4
C 12 M 1/33		C 12 M 1/33	4 B 0 2 9
// C 12 N 15/09	ZNA	C 12 N 15/00	ZNAA 4 B 0 6 5

審査請求 未請求 請求項の数19 O L (全 17 頁)

(21)出願番号 特願平11-141904

(71)出願人 597002416

原 敏夫

福岡県福岡市早良区高取1-1-53-117

(22)出願日 平成11年5月21日 (1999.5.21)

(72)発明者 原 敏夫

福岡県福岡市早良区高取1-1-53-117

(72)発明者 樽井 寛

福岡県福岡市東区菅松4-8-7 コーポ良邦301

(74)代理人 100102978

弁理士 清水 初志 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 無細胞抽出液及び糖蛋白質合成系

(57)【要約】

【課題】 翻訳活性、糖修飾活性を有する細胞抽出液の調製を提供する。

【解決手段】 昆虫細胞をミニポンベ内に収容し、ミニポンベ内に窒素ガスを供給し、加圧する。この圧力を一気に排出し、細胞を破碎し、細胞抽出液を得る。この方法は従来のホモジナイザーを用いた細胞破碎方法よりも緩和な方法であることから、翻訳因子だけでなく、糖鎖修飾活性を担持する因子をも回収可能となり、これにより、翻訳から翻訳後の糖鎖修飾まで行い得るインビトロ糖蛋白質合成系を製造することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 細胞を破碎して調製され、錆型核酸から蛋白質を合成させる活性を有する無細胞抽出液であつて、不活性ガスの雰囲気中、加圧下の前記細胞を減圧させて、前記細胞が破碎されることを特徴とする無細胞抽出液。

【請求項2】 前記細胞が動物細胞であることを特徴とする請求項1に記載の無細胞抽出液。

【請求項3】 雰囲気中に不活性ガス気流が供給されて加圧され、前記不活性ガスが雰囲気中から排出されて減圧されることを特徴とする請求項1又は2に記載の無細胞抽出液。

【請求項4】 前記不活性ガスが窒素であることを特徴とする請求項1～3に記載の無細胞抽出液。

【請求項5】 蛋白質合成活性と合成された蛋白質に糖鎖を付加する糖鎖修飾活性とを有する細胞を破碎して調製され、錆型核酸から糖蛋白質を合成し得る無細胞抽出液であつて、

前記細胞が有する蛋白質合成活性と糖修飾活性とが保存されるように不活性ガスの雰囲気中、加圧下の前記細胞を減圧させて、前記細胞が破碎されることを特徴とする無細胞抽出液。

【請求項6】 前記細胞が昆虫由来であることを特徴とする請求項5に記載の無細胞抽出液。

【請求項7】 雰囲気中に不活性ガス気流が供給されて加圧され、前記不活性ガスが雰囲気中から排出されて減圧されることを特徴とする請求項5又は6に記載の無細胞抽出液。

【請求項8】 前記不活性ガスが窒素であることを特徴とする請求項5～7のいずれかに記載の無細胞抽出液。

【請求項9】 前記加圧時の圧力が、 $2 \sim 14 \text{ kgf/cm}^2$ であることを特徴とする請求項5～8のいずれかに記載の無細胞抽出液。

【請求項10】 前記細胞が $0.25 \sim 1.5 \times 10^8$ 個/ $\text{m}^3$ に調製された状態で破碎されることを特徴とする請求項5～9のいずれかに記載の無細胞抽出液。

【請求項11】 錆型核酸から蛋白質を合成する蛋白質合成活性を有する無細胞抽出液に、請求項5～10に記載された無細胞抽出液が添加されて糖修飾活性が補足され、

錆型核酸から糖蛋白質を合成し得ることを特徴とする無細胞糖蛋白合成用組成物。

【請求項12】 前記蛋白質合成活性を有する無細胞抽出液が、請求項1～4のいずれかであることを特徴とする請求項11に記載の無細胞糖蛋白合成用組成物。

【請求項13】 糖鎖修飾され得る蛋白質をコードしたDNAからmRNAを転写させるmRNA合成手段と、請求項5に記載の無細胞抽出液を含み、mRNA合成手段により合成されたmRNAから糖蛋白質を合成し得る

糖蛋白質合成手段と、を備え、

前記mRNA合成手段によりDNAから転写されたmRNAに基づいて、前記糖蛋白質合成手段により糖鎖修飾された糖蛋白質が合成される、糖蛋白質合成システム。

【請求項14】 前記糖鎖修飾され得る蛋白質をコードしたDNAがプロモータの下流に挿入されて、前記DNAからmRNAを発現させる発現ベクターをさらに備え、

前記発現ベクターには、前記プロモータからの発現により合成されるmRNAに非翻訳領域を付加させる配列であつて、前記無細胞抽出液の調製に使用された細胞内で糖鎖修飾され得る蛋白質の遺伝子由来である非翻訳領域配列が備えられていることを特徴とする請求項13に記載の糖蛋白質合成システム。

【請求項15】 前記細胞が昆虫細胞であり、前記発現ベクター内のプロモータ、非翻訳領域が、前記昆虫細胞を宿主とするウイルス由来であることを特徴とする請求項14に記載の糖蛋白質合成システム。

【請求項16】 前記ウイルスがバキュロウイルスであり、

前記プロモータ、非翻訳領域配列がバキュロウイルスのポリヘドリン由来であることを特徴とする請求項15に記載の無細胞糖蛋白質合成システム。

【請求項17】 請求項5～10のいずれかに記載の無細胞抽出液を用いて生成された糖蛋白質。

【請求項18】 蛋白質合成活性を有する細胞を破碎して、錆型核酸から蛋白質を合成し得る無細胞抽出液を製造するための装置であつて、

前記細胞を収容する容器と、

前記容器内に不活性ガスを充填するガス供給部と、前記細胞が有する蛋白質合成活性を保持した状態で前記容器内の細胞を破碎し得るように、前記容器内の圧力を加圧後、減圧させる圧力制御部と、を備えた無細胞抽出液製造装置。

【請求項19】 前記細胞がさらに合成された蛋白質に糖鎖を付加させる糖鎖修飾活性を有し、前記圧力制御部が、前記細胞が有する蛋白質合成活性及び糖鎖修飾活性を保持した状態で前記容器内の細胞を破碎し得るように、前記容器内の圧力を加圧後、減圧させることを特徴とする請求項18に記載の細胞抽出液製造装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、細胞抽出液を用いて細胞外で蛋白質を合成させるインビトロ翻訳系に関し、特に、細胞抽出液により蛋白質合成とその後の糖鎖修飾とを共に実行させ糖蛋白質を合成し得る系に関する。

【0002】

【従来の技術】生体内の機能情報は核酸上に記録され、

この核酸を錆型として機能分子である蛋白質が翻訳されたり、機能的RNA分子（例えばリボザイム）が転写されたりする。近年、こうした生体機能を担持した核酸、蛋白質の解析が盛んに進められ、また、その一方で、これら核酸、蛋白質の解析方法、解析手段の開発も進められている。

【0003】核酸の解析方法は、特に、ポリメラーゼ錆増幅方法（PCR）等の開発により目覚ましく発展した。このPCRによれば、ポリメラーゼ酵素を含む無細胞の反応液中にプライマーと錆型DNAを添加することにより、この錆型DNAに対するDNA断片を自在に増幅させることができるとなる。すなわち、核酸については、細胞外で自在に合成、増幅させることができとなっている。そして、ここで合成された核酸は、例えば、一次構造（塩基配列）の決定などに供され、これによって、ゲノム解析などの核酸解析の進行を加速化させるに至っている。

【0004】一方、蛋白質の解析方法においても、A.S. Spirinら（Science, 242, 1162-1164(1988)）により大腸菌抽出液を利用した生体外蛋白質合成系が開発されて以来、種々の無細胞翻訳系が開発されている。このような無細胞翻訳系としては、例えば、上記大腸菌の系の他、小麦胚芽、ウサギ網状赤血球などから調製した細胞抽出液を利用したものがある。

【0005】このうちより一般的な小麦胚芽由来の無細胞翻訳系は、小麦胚芽をガラスビーズとともに乳鉢などを用いてすりつぶし、このすりつぶされた小麦胚芽から得た細胞抽出液を用いてmRNAから蛋白質を合成させるものである。すなわち、この小麦胚芽中に存在する蛋白質合成（翻訳）活性を保持しつつ、小麦胚芽から細胞抽出液を回収し、これを用いて細胞外で自在に蛋白質を合成させることができとなっている。

【0006】このように細胞外で蛋白質を自在に合成させることができれば、細胞で蛋白質を合成させる際の複雑な要因や煩雑さを排除して、簡便に所望の蛋白質を得ることが可能となり、蛋白質の解析等を行う上で有利となる。このような観点から、従来より、無細胞翻訳系の改良などがなされており、こうした技術が、例えば、特表平1-503119号公報、特開平4-200390号公報、特開平7-203984号公報などに開示されている。また、このような無細胞翻訳系はキットとしても市販され（Amashan社など）、広く入手可能となっている。

#### 【0007】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、上記従来の無細胞翻訳系では、蛋白質への翻訳を行うことは可能であるが、翻訳された蛋白質の翻訳後修飾を行うことができないという問題がある。すなわち、細胞内において、蛋白質の多くは、錆型核酸から転写されたmRNAに基づいて、蛋白質として翻訳され、この翻訳後に修飾

を受けることが知られている。この翻訳後の修飾の一つとして、糖鎖修飾がある。

【0008】この翻訳後の糖鎖修飾により付加される糖鎖は、物質間や細胞間の認識や接着に関与するシグナルやリガンドとして、蛋白質自身の機能調節因子として、又は蛋白質の保護や安定化因子として機能していると考えられている。そのため、糖鎖修飾を受ける蛋白質について生体内の機能を解析するためには、糖鎖修飾を受けた蛋白質を取得することが必要となる。

【0009】この糖鎖修飾は、蛋白質の特定のアミノ酸に糖鎖を付加させるものであるが、その糖鎖修飾反応は種々異なり、複雑なものであるため、上記無細胞翻訳系で合成された蛋白質に化学的に糖鎖を付加させることは容易なことではない。

【0010】このような問題から生化学的な方法、すなわち、無細胞翻訳系のように細胞抽出液を用いて細胞内の糖鎖修飾活性を利用して蛋白質に糖鎖を付加させる方法が検討され、イヌ組織由来の糖鎖修飾活性を有する抽出液が取得されている。これは、イヌの組織をホモジナイザーで破碎し超遠心分離によりゴルジ体を含むミクロソーム画分を回収することにより調製される。

【0011】このイヌ組織の抽出液は、従来の無細胞翻訳系とは別に使用される。具体的には無細胞翻訳系により蛋白質を合成し、この合成した蛋白質を回収した後に、前記イヌ組織の抽出液内に合成蛋白質を移して糖鎖修飾が行われる。このようにイヌ組織の抽出液が取得されたことから、細胞外で生物学的に糖蛋白質の合成が可能となった。そして、ここで合成された糖蛋白質を蛋白質の機能解析などに使用することにより、従来の無細胞翻訳系で合成された糖鎖修飾が行われていない蛋白質に比して、より細胞内における反応を反映させた解析を行うことが期待できる。

【0012】しかしながら、従来のイヌ組織抽出液を用いた糖蛋白質の合成では、無細胞翻訳系で蛋白質を合成させた蛋白質を回収し、その後に糖鎖修飾されることになる。このように、無細胞翻訳系と糖鎖修飾系を別々に用いて糖蛋白質を合成することは、一般的に変性し易い蛋白質には好ましくなく、このような複数の過程を経ることにより基礎となる蛋白質が変性し、活性低下をもたらすことも考えられる。また、蛋白質への物理的な影響に加えて、糖蛋白質を合成するに当たり、上記のような2段階の系を準備し、これを用いて2段階で糖蛋白質を合成させることは、変性し易い蛋白質を操作する操作者にとっても高度な注意力などが要求され煩雑な作業となる。

【0013】また、糖鎖修飾を行い得る細胞抽出液に限ても、現在のところイヌ組織のように限定した組織由来のものが使用可能となっているにすぎず、普遍的な組織細胞から糖鎖修飾活性を回収するには至っていない。糖鎖の種類は、細胞種により異なり、このことから細胞

種により糖鎖修飾反応が異なることが予想されている。そのため、種々の細胞から糖鎖修飾活性を回収することが可能となれば、蛋白質の糖鎖修飾を自在にデザインすることも可能となる。

【0014】さらに、近年では、医薬の分野において、種々の蛋白製剤が開発されているが、この蛋白製剤の効果については、その成分となる蛋白質の糖鎖の有無、種類などに影響されることが知られている。そのため、種々細胞からの糖鎖修飾活性を回収することができれば、このような蛋白製剤の開発、改良などにも大きく貢献することが期待される。

【0015】そこで、本願発明者らは、上記課題に鑑み、蛋白質合成から糖鎖修飾までの一連の過程を一つの系内で行えるような細胞抽出液の調製について鋭意研究を行い、この研究を通して、従来の無細胞翻訳系の調製とは異なる新規な無細胞抽出液の調製を可能にし、この抽出液を利用して蛋白質合成から糖鎖修飾までの一連の過程を一つの系内で行うことを可能にした。

#### 【0016】

【課題を解決するための手段】上記の通り、本願発明者らは、細胞抽出液の調製について検討した結果、以下のような細胞抽出液の調製を可能にした。本発明の細胞抽出液の調製は、具体的には、細胞を取り巻く環境の圧力を加圧から減圧へと変化させるという緩和な手段で細胞を破碎させ、少なくとも細胞が有する蛋白質合成活性をさらには糖鎖修飾活性をも細胞抽出液中に回収させる。

【0017】すなわち、本発明の無細胞抽出液は、細胞を破碎して調製され、鑄型核酸から蛋白質を合成させる活性を有する無細胞抽出液であって、不活性ガスの雰囲気中、加圧下の前記細胞を減圧させて、前記細胞が破碎されることを特徴とする。

【0018】上記発明によれば、従来のようなホモジナイザーのように細胞をすりつぶさず、圧力変化により細胞を破碎又は破裂させて調製される。このように圧力変化により細胞を破碎させることにより、従来のホモジナイザーのような破碎方法に比して、緩和な条件で細胞を破碎させることが可能となり、細胞内の器官などへの影響を低減させることが可能となる。

【0019】また、本発明の無細胞抽出液は、蛋白質合成活性と合成された蛋白質に糖鎖を付加する糖鎖修飾活性とを有する細胞を破碎して調製され、鑄型核酸から糖蛋白質を合成し得る無細胞抽出液であって、前記細胞が有する蛋白質合成活性と糖修飾活性とが保存されるように不活性ガスの雰囲気中、加圧下の前記細胞を減圧させて、前記細胞が破碎されることを特徴とする。

【0020】このように本発明によれば、蛋白質合成（翻訳）活性と糖鎖修飾活性とを有する細胞をこれら両活性を破壊しないような圧力変化により破碎させることにより両活性を保持した細胞抽出液が調製される。これにより、従来、別に調製されていた無細胞翻訳系と糖鎖

修飾系とを合わせ持つ系として作り出すことができ、この系を利用することにより、蛋白質合成と糖鎖修飾とを一つの細胞抽出液で実行させることができるとなる。

【0021】さらに、本発明は無細胞糖蛋白質合成用組成物を提供する。この無細胞糖蛋白質合成用組成物は、蛋白質合成活性を有する細胞抽出液に上記糖鎖修飾活性を有する細胞抽出液を添加して構成される。このように糖鎖修飾活性を有する細胞抽出液を、それ自身では蛋白質合成活性のみを有する細胞抽出液に添加することにより、糖鎖修飾活性を補足して、蛋白質合成活性とともに糖鎖修飾活性をも有する組成物を構成させることができる。

【0022】また、本発明は、糖蛋白質合成システムを提供する。この糖蛋白質合成システムは、糖鎖修飾され得る蛋白質をコードしたDNAからmRNAを転写させるmRNA合成手段と、上記蛋白質合成活性と糖鎖活性とを有する無細胞抽出液又は組成物によりmRNA合成手段により合成されたmRNAから糖蛋白質を合成し得る糖蛋白質合成手段と、を備え、前記mRNA合成手段によりDNAから転写されたmRNAに基づいて、前記糖蛋白質合成手段により糖鎖修飾された糖蛋白質が合成されることを特徴とする。

【0023】本システムによれば、鑄型DNAさえ準備すれば、この鑄型DNAからmRNAを介して簡便に糖蛋白質を合成させることができるとなる。

【0024】また、上記糖蛋白質合成システムには、さらに前記糖鎖修飾され得る蛋白質をコードしたDNAをプロモータの下流に挿入させ、前記DNAからmRNAを発現させる発現ベクターを備えることができる。このように、さらに発現ベクターを備えることにより、例えば、ゲノム中の興味のある遺伝子を切り出し、本発現ベクターに接続することにより、糖蛋白質を簡便に合成させることができるとなる。

【0025】上記発現ベクターには、前記プロモータからの発現により合成されるmRNAに非翻訳領域を付加させる配列であって、前記無細胞抽出液の調製に使用された細胞内で糖鎖修飾され得る蛋白質の遺伝子由来である非翻訳領域配列が備えられていることを特徴とする。このように当該細胞内で糖蛋白質を生成する遺伝子の非翻訳領域を備えることにより、合成蛋白質への糖鎖修飾の効率を向上させることができるとなる。

【0026】また、上記本発明による無細胞抽出液、組成物、糖蛋白質合成システムを用いれば簡便に糖蛋白質が生成できることから、糖蛋白質を用いた細胞内の機能解析を容易に行うことが可能となる。

【0027】さらに本発明は、無細胞抽出液製造装置を提供する。この無細胞抽出液製造装置は、蛋白質合成活性を有する細胞を破碎して、鑄型核酸から蛋白質を合成し得る無細胞抽出液を製造するための装置であって、前記細胞を収容する容器と、前記容器内に不活性ガスを充

填するガス供給部と、前記細胞が有する蛋白質合成活性を保持した状態で前記容器内の細胞を破碎し得るよう前記容器内の圧力を加圧後、減圧させる圧力制御部と、を備えたことを特徴とする。

【0028】また、上記無細胞抽出液製造装置は、前記細胞がさらに合成された蛋白質に糖鎖を付加させる糖鎖修飾活性を有し、前記圧力制御部が、前記細胞が有する蛋白質合成活性及び糖鎖修飾活性を保持した状態で前記容器内の細胞を破碎し得るよう前記容器内の圧力を加圧状態から減圧状態へと変化させることを特徴とする。

【0029】これら無細胞抽出液製造装置を用いれば、蛋白質合成活性を有する細胞抽出液又はさらに糖鎖修飾活性をも有する細胞抽出液を簡便に製造することが可能となる。

【0030】

【発明の実施の形態】以下、本発明の好適な実施形態を用いて説明する。

【0031】[無細胞抽出液の調製]無細胞抽出液は、不活性ガスの雰囲気中、加圧下の細胞の圧力を減圧することにより、細胞を破碎して調製される。

【0032】上記無細胞抽出液の調製に使用できる細胞は、錆型核酸から蛋白質を合成させる翻訳活性と、翻訳後の糖鎖修飾を実行する糖鎖修飾活性を有する細胞であれば、いかなる細胞でもよく、原核細胞から真核細胞まで広く含めることができる。例えば、ほ乳類、鳥類、は虫類、両生類、魚類、植物、微生物等の細胞が挙げられる。そして、こうした幅広い細胞のうち翻訳活性を回収し得る細胞は好適には哺乳動物細胞、昆虫細胞などを採用することができる。また、翻訳活性と糖鎖修飾活性を回収する場合には、昆虫細胞などを好適に使用することができる。なお、これらの細胞は、組織中の又は組織から採取した細胞でもよく、また培養細胞であってもよい。

【0033】上記細胞は、破碎を行う間中、不活性ガスの雰囲気中に配置される。この不活性ガスは、細胞破碎後の抽出液が空気と接触して翻訳活性等に影響を与えないように用いられる。従って、この目的が達成できるものであれば、不活性ガスの種類に限定はなく、例えば、窒素ガス、アルゴンガスなどを使用することができる。

【0034】上記細胞を破碎する際の加圧時の圧力は、細胞種により適宜決定することができる。この圧力は、用いる細胞の外周を覆う膜や壁などの強度、内部の翻訳、翻訳後の修飾に与する因子の耐圧性などを考慮して、最終的に採取される抽出液の翻訳活性を指標として決定することができる。例えば、昆虫由来の細胞の場合には、2~14 kgf/cm<sup>2</sup>とすることでき、より好ましくは、5~8 kgf/cm<sup>2</sup>とすることでき、さらに好ましくは8 kgf/cm<sup>2</sup>とすることができる。また、CHO細胞の場合には、昆虫細胞よりも比較

的高い圧力であることが好適であり、具体的には2~32 kgf/cm<sup>2</sup>とすることができる。

【0035】また、加圧時間も各細胞種等により適宜決定することができる。この決定に当たっても、用いる細胞の外周を覆う膜や壁などの強度、内部の翻訳、翻訳後の修飾に与する因子の耐圧性などを考慮して、最終的に調製される抽出液の翻訳活性を指標とすることができる。例えば、昆虫由来の細胞の場合には、3~120分間、好ましくは、30から120分間、さらに好ましくは60~90分間とすることができる。

【0036】また、加圧後の減圧は、細胞を破碎し得るよう急激に圧力を減少させればよく、減圧後際の圧力は、常圧程度あるいは圧力を機械的に引き常圧よりもさらに低い圧力とすることもできる。

【0037】上記加圧状態から減圧状態への圧力変化は、細胞が収容された雰囲気内へのガスの供給及び排出により、又は細胞が収容される体積の縮減、拡張により行うことができる。ここで前者のガスの供給及び排出による場合には、このガスとして上記不活性ガスを好適に用いることができる。

【0038】最終的に、細胞破碎後の抽出液を回収することにより無細胞抽出液が調製される。この無細胞抽出液とは、主として、生存細胞内の細胞液と区別する意味で用いられ、上記破碎後の細胞残渣の混在の有無は問わない。従って、上記の破碎後の細胞抽出液は、残渣が存在する状態として、又、必要に応じて破碎された細胞の残さを遠心分離などにより除去した上で、無細胞抽出液とすることができる。

【0039】また、ここで調製された無細胞抽出液は、特定の細胞由来のものを単独で使用することもできるが、特定の細胞由来の抽出液の単独使用によっては蛋白質合成活性は有するが糖鎖修飾活性が低い又は発揮しない場合には、糖鎖修飾活性を有する他の細胞由来の無細胞抽出液を適当な割合で添加して糖鎖修飾活性を補足させることができる。例えば、CHO細胞由来の無細胞抽出液のように、単独使用によっては蛋白質合成活性は有するが糖鎖修飾活性を発揮しない場合に、昆虫細胞由来の糖鎖修飾活性をも有する無細胞抽出液などを適宜添加して、糖鎖修飾活性を補足させることもできる。

【0040】[糖蛋白質合成システム]次に、上記無細胞抽出液を用いて、翻訳、糖鎖修飾を行ための基質となる錆型核酸について説明する。

【0041】1、発現ベクター

蛋白質合成(翻訳)に当たっては、その錆型としてmRNAが必要となり、また、このmRNA生成(転写)には、その錆型としてDNAが必要となる。ここでは、このmRNA合成の基礎となる錆型DNAを含む発現ベクターについて説明する。

【0042】発現ベクターには、蛋白質合成の基礎となるmRNAを合成するために、蛋白質をコードした所望

の配列が挿入される。この蛋白質コード配列は、特に限定はないが、上記無細胞抽出液が蛋白質合成後の糖鎖修飾も行い得るため、この蛋白質コード配列としては、糖鎖修飾され得る蛋白質をコードした配列を好適に用いることができる。

【0043】上記発現ベクターにおいて、上記蛋白質をコードした配列の上流には転写を開始させるプロモータが備えられる。このプロモータとしては、特に限定はないが、一本鎖のmRNAを合成するためには、種々のRNAポリメラーゼプロモータを好適に用いることができる。その例として、T7 RNAポリメラーゼプロモータ、T3 RNAポリメラーゼ、SP6 RNAポリメラーゼ等が挙げられる。

【0044】また、発現ベクターには、上記蛋白質コード配列を挟むように、その両端に隣接して5'、3'非翻訳領域(UTR)配列が備えられ、これら配列は、mRNAとして合成された際にmRNAの両端にUTRとして付加され翻訳の制御を行う。このUTR配列は、無細胞抽出液を用いて翻訳を行わせる際に制御配列として機能するため、この配列は無細胞抽出液の調製に使用された細胞に応じて選択することが好ましく、例えば、当該細胞由来のUTR又はこのような細胞に感染するウイルス、ファージなどに由来するUTRを用いることができる。

【0045】例えば、上記無細胞抽出液の調製に昆虫細胞を用いた場合には、このUTRとしては昆虫細胞由来のUTR又は昆虫細胞に感染能を有するウイルス、例えばバキュロウイルスなどに由来するUTRを用いることができる。

【0046】また、上記発現ベクターには、自己複製能を保持させることができが好ましい。このような自己複製能は種々のプラスミド、ウイルスDNAなどが有する自己複製能を利用することができる。これらは、この発現ベクターを増幅させるための宿主又は本ベクターによる発現を行わせるための宿主に応じて適宜選択することができる。例えば、宿主として大腸菌を選択する場合には、発現ベクターとしてpUC系、pBR系プラスミドを用いることができる。また、哺乳動物細胞を宿主とする場合には、SV40等のウイルスDNA等を好適に利用することができる。必要であれば、複数の自己複製能を備えさえ、異なる宿主において自己複製能を有するシャトルベクターとして構成することもできる。

#### 【0047】2、mRNAの合成

上記発現ベクターを用いてmRNAを合成させるには、RNAポリメラーゼなどの転写因子が必要となる。このような転写因子は、生存細胞が保持する転写因子を利用することができる。すなわち、この生存細胞内に上記発現ベクターを導入し、細胞内の転写因子を利用してmRNAを合成させることができる。ここで合成されたmRNAは、既知の方法に従って細胞内の他のmRNAから

分離精製することにより、目的のmRNAが調製される。

【0048】上記のように細胞内の転写因子を利用した場合には、細胞内の無数のmRNAから目的のmRNAを精製することが必要となるが、このようなmRNA精製操作を簡略化するためには、この転写因子は、細胞から採取した転写活性を有する抽出液、インビトロ転写系を利用することができる。インビトロ転写系としては、例えば、T7ファージ由来の転写反応系、大腸菌由来の転写反応系等を例示できる。この系を用いたmRNA合成は、市販のキット、例えばMega Script<sup>TM</sup> (Ambion社)、Ribomax<sup>TM</sup> (Promega社)などを利用して実施することができる。

【0049】このようにmRNAの合成(転写工程)をインビトロで行った場合には、mRNA合成(転写)工程から後述する蛋白質合成(翻訳)及びその後の糖鎖修飾工程までの一連の工程を細胞外、すなわちインビトロで実行させることができる。

#### 【0050】3、蛋白質の翻訳、糖鎖修飾

インビトロ翻訳及び糖鎖修飾反応は、基本的に上記蛋白質合成活性並びに糖鎖修飾活性を有する無細胞抽出液に、上記mRNAを添加することにより実行することができる。すなわち、上記無細胞抽出系には、蛋白質合成する翻訳活性と、この翻訳後の糖鎖修飾活性とを有しているため、上記無細胞抽出系へのmRNAの添加により、当該mRNAから蛋白質が合成され、その後、この蛋白質に対する糖鎖修飾が行われて糖蛋白質が合成される。

【0051】また、上記において糖蛋白質を合成するに当たっては、細胞抽出液に酢酸マグネシウム、酢酸カリウム、スペルミジン、GTP、ATP、クレアチニンキナーゼ、バッファなどを添加して、細胞抽出液を調製することができる。一例として、昆虫細胞の細胞抽出液においては、最終濃度を10.6mM HEPES-KOH (pH 7.95)、1.3mM酢酸マグネシウム、100mM 酢酸カリウム、2.5mM DTT、0.25mMスペルミジン、44.4μg/mlクレアチニンキナーゼ、8.0mMリン酸クレアチン、1.2mM ATP、0.25mM GTPに調製し、翻訳反応に供することができる。また、細胞抽出液に、アミノ酸混合液を添加することができる。この混合液は、例えば、終濃度が25μM程度になるように添加することができる。

【0052】また、蛋白質合成に当たっては、mRNAを細胞抽出液に添加する必要があるが、この添加量は、従来のインビトロ翻訳系と同様な添加量とすることができ、例えば、細胞抽出液に対して終濃度200μg/mlとなるように添加することができる。このような方法で合成された蛋白質は、必要に応じて細胞抽出液から単離された後、種々の目的にこの合成蛋白質(又は糖蛋白質)を利用することができる。

【0053】[翻訳装置]上記細胞抽出液の調製から、蛋白質(糖蛋白質)の合成までを自動化してもよい。このような装置は次のように構成することができる。

【0054】翻訳装置10は、細胞から無細胞抽出液を調製するための抽出液調製部12と、この抽出液を用いて蛋白質合成を行わせる翻訳部14とが設けられる。

【0055】この抽出液調製部12は、内部に細胞が収容され、この内部で細胞が破碎され、抽出液が調製される。この細胞の破碎は、抽出液調製部12の内部の圧力変化により実行される。この圧力変化を実行するためには、抽出液調製部12には、不活性ガスを収容し、前記抽出液調製部に不活性ガスを供給するための不活性ガス供給部16が設けられている。すなわち、この不活性ガス供給部16は、不活性ガスを抽出液調製部12へ送り込むことにより、調製部12の内部の圧力を上昇させ、収容された細胞に圧力を加える。また、この不活性ガス供給部16から供給された不活性ガスは、細胞破碎後の抽出液が空気(酸素)と接触することを防止し、抽出液中の種々の活性低下を防止する。

【0056】また、上記抽出液調製部12には、送り込まれた不活性ガスを排出し、調製部12の内部の圧力を減圧させ、細胞を破碎(破裂)させるための排出口18が設けられる。

【0057】これら抽出液調製部12への不活性ガスの送込み、その排出により圧力変化を制御するために、抽出液調製部12には、制御部20が備えられる。この制御部20は、細胞を被覆する膜、壁の強度などに応じた制御を可能とし、細胞破碎後の細胞抽出液中に蛋白質合成活性、糖鎖修飾活性を回収させる。

【0058】一方、翻訳部14は、上記抽出液調製部において調製された抽出液が供給可能となるように前記抽出液調製部12に接続される。この翻訳部14の内部に、図1には示していないが反応容器が備えられ、この反応容器に前記抽出液が注入される。また、この翻訳部14には、試料注入部が備えられ、この試料注入部により蛋白質合成の基質となるmRNAが反応容器に注入される。

【0059】上記翻訳装置10によれば、細胞を抽出液調製部12に供給することにより、抽出液調製部12において細胞が破碎され、細胞抽出液が調製される。そして、ここで調製された細胞抽出液は、翻訳部14において、反応容器内に供給され、これにmRNAが添加されて、糖蛋白質の合成が行われる。

【0060】なお、上記翻訳装置において、必要であれば、発現ベクターからmRNAを生成させる転写部を備え、この転写部において翻訳装置に供給するmRNAを生成させてもよい。このように、転写部を備えた場合には、発現ベクターからmRNAを介して糖蛋白質の合成までの一連の工程を自動化させることが可能となる。

【0061】

【実施例】以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0062】[実施例1] 発現ベクターの調製

糖鎖修飾されることが知られている蛋白質として、HIV(ヒト免疫不全症ウイルス)のGP120を用い、この糖蛋白質のインビトロの合成を試みた。この糖蛋白質の合成に当たり、このgp120mRNAを発現させる発現ベクターを以下の通り構築した。なお、図2に発現ベクターの構築方法を模式的に、図3には、発現ベクターから発現されるポリヘドリンUTRを備えたgp120mRNAの構成を示した。また、このポリヘドリン5'-UTRの塩基配列を配列番号1に、3'-UTRの塩基配列を配列番号2に示す(Robert, D.ら、Virology 185, 229-241 (1991))。

【0063】図2において、まず、pVL1393-gp120プラスミドをPCRにより、点変異を挿入し、gp120の両端にEcoRIとSalIの認識部位を形成させた。この変異挿入後のプラスミドをEcoRIとSalI制限酵素で切断し、若干両端が欠けているgp120'断片を単離した。一方、発現ベクターの骨格となるプラスミドpUC18も同様にEcoRIとSalI制限酵素で切断し、そこに上記gp120'断片を挿入し、pUC18-1とした。

【0064】次に、XhoI又はSalIを末端に有する2つのプライマーを用いて、PCRによりpVL1393-gp120プラスミドからgp120の3'端の残りの配列と3'UTR配列を増幅させ、この増幅断片をpUC18-1のSalI部位に挿入し、これをpUC18-2とした。

【0065】gp120の5'端の残りの配列及び5'UTR配列は、合成により生成し、この合成の際に、5'UTRの上流にT7RNAポリメラーゼプロモータ配列番号3を附加した。さらに、この合成断片はPCRにその両端にEcoRI部位が挿入され、この断片をpUC18-2のEcoRI部位に挿入させた。これにより、T7RNAポリメラーゼプロモータ配列の下流にUTR配列を含むgp120発現カセットが挿入されたpUC18-gp120プラスミドが生成された。

【0066】このpUC18-gp120プラスミドを、MEGAscript<sup>TM</sup>(Ambion社)を用いてインビトロにて転写させ、図3に示すgp120mRNAを調製した。以下、このgp120mRNAを錆型として糖蛋白質の合成における種々の検討を行った。

【0067】(1) 細胞数の影響

細胞抽出液の調製には、昆虫細胞Sf21細胞(J. L. Vaughn, R. H. Goodwin, G. L. Tompkins, and P. McCawley, In Vitro, 13, 213-217 (1977))を用いて行った。Sf21細胞の異なる細胞濃度の細胞懸濁液をミニボンベ(MINI-BOMB CELL DISRUPTION CHAMBER (KONTES社製))内に

それぞれ入れ、窒素ガス圧8kgf/cm<sup>2</sup>で、30分間処理した。この処理後の各細胞液を遠心分離 (BECKMAN社製L7U 1tracentrifuge 55型、ローターSW40Tiロータ、14000rpm×15min)により、細胞抽出液を得た。

【0068】上記で調製された細胞抽出液を用いて翻訳能を調べた。翻訳能の解析を行うために、上記g p 120mRNAを最終濃度200μg/mlとなるように細胞抽出液に添加し、翻訳反応を実行させた。反応後の蛋白質を2つの方法で定量した。一つは、ビオチン標識リ

ジンtRNAの翻訳産物への取込み量をアビシンにより検出する方法である。他の方法は、GP120の抗体を用いたウエスタンブロッティング法により翻訳産物を検出し、検出した産物をDensitrometer (FastScan、Molecular Dynamics社製)で定量する方法を採用した。これら定量法により翻訳能を評価した。その結果を表1に示す。

【0069】

【表1】

細胞数の影響

細胞密度 (10 <sup>8</sup> cells/ml)			
	1.5	1.0	0.5
翻訳能 (%)	91	100	44
			1.7

表1に示すように、細胞抽出液が翻訳能を維持するためには好ましい細胞数は0.25~2.5×10<sup>8</sup>個/mlの範囲で、特に1.0×10<sup>8</sup>個/mlの細胞数が最適であった。

【0070】(2) 窒素ガス圧の影響

ミニボンベ中の窒素ガス圧を2~14kgf/cm<sup>2</sup>の範囲で翻訳能に及ぼす影響を上記と同様に検討した。細胞数は上記において好適であった細胞数1.0×10<sup>8</sup>個/mlとし、窒素

ガス処理時間は30分間に設定して細胞を破碎した。得られた細胞抽出液にg p 120mRNAを最終濃度200μg/mlとなるように添加し、翻訳反応を実行させた。各ガス圧条件下での蛋白質合成量から翻訳能を比較した。その結果を表2に示す。

【0071】

【表2】

窒素ガス圧の影響

窒素ガス圧 (kg/cm <sup>2</sup> )		
	5	8
翻訳能 (%)	99	100
		64

表2に示すように、窒素ガス圧は、2~14kgf/cm<sup>2</sup>の範囲とすることができ、好ましくは、5~8kgf/cm<sup>2</sup>の範囲とすることができます。最適には、窒素ガス圧は、8kgf/cm<sup>2</sup>であった。

【0072】また、図4には、5、8、14kgf/cm<sup>2</sup>の加圧条件で調製したS f細胞抽出液を用いて、g p 120mRNAから蛋白質を合成し、ここで合成された蛋白質を分画した際の分画パターンを示す。図4のレーン2、4、6に示すように、5~14kgf/cm<sup>2</sup>の加圧条件により調製された細胞抽出液において、mRNA

NAから特異的に糖蛋白質 (図4において、矢印1として示す)が合成されていることが示され、特に、8、14kgf/cm<sup>2</sup>の加圧条件による細胞抽出液において良好な糖蛋白質合成が検出された。

【0073】(3) 窒素ガス加圧時間の影響

細胞数を1.0×10<sup>8</sup>個/ml、窒素ガス圧を8kgf/cm<sup>2</sup>とし、細胞抽出液を調製するための窒素ガス加圧時間を検討した。

【0074】

【表3】

窒素ガスによる加圧時間の影響

加圧時間 (分)							
	3	5	10	15	30	60	90
翻訳能 (%)	25	40	56	63	76	100	100
						46	

表3に示すように、3分間以上の加圧時間であればよく、特に30~60分間の加圧時間が好適であった。

【0075】(4) 噴出速度の影響

ミニボンベ内から細胞破碎液を噴出させる速度を15~200ml/secの範囲で検討した。噴出速度は翻訳能に影響を及ぼさなかった。

【0076】[実施例3] 翻訳反応条件の検討

(1) mRNA濃度の至適化

翻訳反応の際ににおける細胞抽出液へのmRNA添加量の

検討を行った。上記S f細胞抽出液にg p 120mRNAを3、12.5μg/mlから400μg/mlまで順次2倍濃度となるようにそれぞれ添加し、翻訳能、糖鎖修飾能を測定した。その結果を図5に示す。なお、図5において、丸印は、糖鎖がついていないGP120を、菱形印は、糖鎖が付加されていないGP120を示す。

【0077】図5に示すように、200μg/mlにおいてGP120 (糖鎖未付加)の生成が高く翻訳能を効率的に利用することができることが示された。一方、糖

蛋白質は、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上であれば、ほぼ一定の高い値を示した。

【0078】(2) 反応温度及び反応時間の影響

翻訳反応時の温度条件を検討した。細胞抽出液にgp 120mRNAを最終濃度 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加し、 $15^\circ\text{C}$ ～ $45^\circ\text{C}$ の温度下で、30、60、90分間反応を行わせ、その際の翻訳産物の生成量を測定した。なお、ここでは細胞数 $1.0 \times 10^8$ 個/mlとし、窒素ガス処理時間は30分間に設定して細胞を破碎して調製された細胞抽出液を用いた。

【0079】相対生成量をグラフ化したものを図6に示す。図6に示すように、反応温度 $25^\circ\text{C}$ において、翻訳及び糖鎖修飾活性が示され、特に、糖鎖修飾活性においては反応時間60分の周辺に活性のピークが存在し、また翻訳活性においては、30分から60分のあたりにピークが存在することが推測された。

【0080】一方、 $37^\circ\text{C}$ では、 $25^\circ\text{C}$ に比して、翻訳及び糖鎖修飾活性が半分程度に低下し、 $45^\circ\text{C}$ では著しく両活性が低下した。また、 $15^\circ\text{C}$ では、両活性とも低いが、糖蛋白質については時間に比例して生成量が上昇するパターンが示された。

【0081】なお、図7には、紫蚕の細胞を上記Sf細胞と同様の条件で細胞破碎を行い調製した紫蚕細胞抽出液を用いて、同様に反応温度、反応時間によるGP120の生成率を比較したグラフを示す。紫蚕においても、 $25^\circ\text{C}$ の反応温度で良好な翻訳及び糖鎖修飾活性が示された。

【0082】(2) 試薬などの添加の影響

細胞抽出液に種々の試薬を添加した際の翻訳能への影響を調べた。ここでは、酢酸マグネシウム、酢酸カリウム、スペルミジン、GTP、ATP、クレアチニンキナーゼについて、それぞれ細胞抽出液に一定の範囲の濃度で添加し、gp 120mRNAからの蛋白質又は糖蛋白質の生成量を相対的に定量し、翻訳能、糖鎖修飾能を検討した。

【0083】図8に酢酸マグネシウム濃度を検討した結果を示す。なお、図8において、丸印は、糖鎖がついていないGP120を、菱形印は、糖鎖が付加されたGP120を示す。

【0084】図8に示すように、酢酸マグネシウムについては、 $1.5 \text{mM}$ において良好な翻訳活性が示され、また、糖鎖修飾活性については、 $2 \text{mM}$ において良好な結果が示された。

【0085】図9に酢酸カリウム濃度を検討した結果を示す。酢酸カリウムについては、 $100 \text{mM}$ において、翻訳活性及び糖鎖修飾活性が高いことが示された。なお、図9において、図8と同様に丸印は、糖鎖がついていないGP120を、菱形印は、糖鎖が付加されたGP120を示す。

【0086】図10には、スペルミジン濃度を検討した

結果を示す。スペルミジンについては、 $0.25 \text{mM}$ において、蛋白生成量（糖非付加）がもっとも高く、 $0.25 \text{mM}$ が好適であることが示された。なお、図10（以下、図11、12、13においても同様）において、実線は、糖鎖がついていないGP120を、点線は、糖鎖が付加されたGP120を示す。

【0087】図11には、GTP濃度を検討した結果を示す。GTPについては、 $0.25 \text{mM}$ において、蛋白生成量（糖非付加）がもっとも高く、この濃度範囲において効率良く翻訳が行われることが示された。一方、糖蛋白質の生成はGTP濃度に大きく影響されないことが示された。

【0088】図12には、ATP濃度を検討した結果を示す。ATPについては、 $1 \sim 1.5 \text{mM}$ において、蛋白生成量（糖非付加）がもっとも高く、この濃度範囲において効率良く翻訳が行われることが示された。一方、糖蛋白質の生成は $0.5 \text{mM}$ において若干高い値が示されているが、ATP濃度に大きく影響されないことが示された。

【0089】図13(a) (b)において、クレアチニンキナーゼ濃度を検討した結果を示す。図13(a) (b)に示すように、2回の実験を通して、翻訳活性は $400 \mu\text{g}/\text{ml}$ でもっとも良好な結果が示された。一方、糖鎖修飾活性については、 $400 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上において良好な結果が示された。

【0090】これら結果を総合して、以下に示す実施例においては細胞抽出液を次の組成に調製して、 $25^\circ\text{C}$ にて翻訳反応を行った。

【0091】

虫細胞抽出液	$A_{260}=3.0, 4$
HEPES-KOH (pH 7.95)	終濃度 $10, 6 \text{mM}$
酢酸マグネシウム	終濃度 $1, 3 \text{mM}$
酢酸カリウム	終濃度 $100 \text{mM}$
DTT	終濃度 $2, 5 \text{mM}$
スペルミジン	終濃度 $0, 25 \text{mM}$
クレアチニンキナーゼ	終濃度 $444 \mu\text{g}/\text{ml}$
リン酸クレアチ	終濃度 $8, 0 \text{mM}$
ATP	終濃度 $1, 2 \text{mM}$
GTP	終濃度 $0, 25 \text{mM}$
アミノ酸混液	終濃度 $25 \mu\text{M}$
mRNA	終濃度 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$

【実施例4】昆虫細胞抽出液を利用した翻訳産物の同定 H1V患者抗血清を用いたウエスタンブロッティングにより、上記昆虫細胞抽出液を用いて合成された翻訳産物GP120を解析した。解析結果を図14、図15に示す。

【0092】図14に示すように、GP120は、SDS-PAGE上で90kDaと56kDaに相当する位置に検出された（レーン2、3）。一方、バキュロウイルス-昆虫細胞系でSf21細胞により発現したGR120は糖蛋白質で、90

kDaの位置に非常に強いバンドとして検出される(レーン5、6)。このことはSf細胞抽出液を用いて合成された翻訳産物に糖鎖が付加されている可能性を示唆する。

【0093】一方、ウサギ網状赤血球と小麦胚芽から調製したコントロールの細胞抽出液において、得られた翻訳産物は56kDaの位置に強くバンドが検出され(図15、レーン4、6)、昆虫細胞抽出液(レーン2)を用いて合成された翻訳産物のように90kDaの位置に相当するバンドは検出されなかつた。このことは、昆虫細胞抽出液で合成されたGP120においてのみ糖鎖付加などの翻訳後修飾が行われた可能性が強く示唆された。

#### 【0094】[実施例5] 翻訳反応産物の脱糖鎖

実施例4によりSf21細胞抽出液を用いて翻訳反応により合成された翻訳産物GP120が糖鎖修飾された糖蛋白質であることを確認するために、糖分解酵素を用いて翻訳産物GP120を処理した。ここで糖分解酵素として、N-glycosidaseF、endoglycosidaseFあるいはendoglycosidaseHなどのN型糖鎖分解酵素を用いた。分解反応の結果を図16に示す。

【0095】図16に示すように、GP120を上記N型糖分解酵素で処理した結果、無処理の画分に存在する90kDaのバンドが消失し、それに変わって、無処理のサンプルでは認められない位置(矢印で示す位置)に新たな蛋白質のバンドが検出された。これは、脱糖鎖により生じたバンドシフトであることを示し、翻訳反応産物GP120にN型糖鎖が付加されていることを強く示唆した。なお、同様にO-glycosidaseでも処理を行つたが、O型糖鎖の付加は認められなかつた(図示せず)。

【0096】また、翻訳産物が糖鎖を有するかを他の方法により検討した。上記GP120蛋白質をレクチン-セファロースカラムに供し、メチル- $\alpha$ -D-マンノピラノシドにより溶出させて分画を行つた。そして、ここで得られた素通り画分と、メチル- $\alpha$ -D-マンノピラノシドによる溶出画分とを、HIV患者抗血清を用いてウエスタンプロッティングを行つた。その結果、メチル- $\alpha$ -D-マンノピラノシドによる溶出画分にのみ、上記90kDaに相当する位置にgp120のバンドが検出された(図示せず)。このことからも、翻訳産物GP120が、糖鎖を有する糖蛋白質であることを強く示唆した。

#### 【0097】[実施例6] 種々のmRNAを用いた糖蛋白質合成解析

UTR、シグナル配列などの制御配列、および糖鎖修飾され得る蛋白質をコードしたコード配列について、上記実施例とは異なるmRNAを調製して、翻訳、糖鎖修飾が行われるかを調べた。なお、ここで用いたUTRは、バキュロウイルスのポリヘドリン由来、ウシ成長ホルモン(BGH)由来のものを用いた。またシグナル配列としては、インターロイキン6(IL6)由来(配列番号5)、ニワトリリソチーム(cL)由来(配列番号4)を用いた。また、コード配列は、共通してインターロイキン6(IL6)コード配列を用いた。これらは実施例1と同様にpUC18を用いて発現プラスミドとして構築され、これを用いてmRNAを生成し、以下の翻訳、糖鎖修飾活性を調べた。その結果の一覧を表4に示す。

#### 【0098】

#### 【表4】

		翻訳/糖付加	昆虫	紫蚕	ウサギ	小麦胚芽
1	B MV タンパク2a	翻訳	+	+	++	+
2	タンパク2a	翻訳	±	±	++	++
3	外被タンパク	翻訳	+	+	±	++
4	SF162 gp120	翻訳 糖付加	+	+	+	+
			+	+	-	-
発現系	5'-UTR	シグナル コードタンパク	3'-UTR			
5 ppIL6p	ポリヘドリ	IL6	IL6	ポリヘドリ	翻訳	- ND
6 ppCIL6p	ポリヘドリ	cL <sup>a)</sup>	IL6	ポリヘドリ	翻訳 糖鎖付加	+ + + ND
7 pp(-)IL6p	ポリヘドリ	なし	IL6	ポリヘドリ	翻訳	+ + + ND
8 pBILIL6B	BGH <sup>b)</sup>	IL6	IL6	BGH	翻訳	- ND - ND
9 pBCIL6B	BGH	cL	IL6	BGH	翻訳	- ND ± ND
10 pB(-)IL6B	BGH	なし	IL6	BGH	翻訳	- ND ± ND
11 ppCIL6B	ポリヘドリ	cL	IL6	BGH	翻訳 糖鎖付加	+ ND + ND ND
12 pBCIL6p	BGH	cL	IL6	ポリヘドリ	翻訳	- ND - ND

a) cL: chicken lysozyme

b) BGH: bovine growth hormone

c) ND: not determined

実施例1に示したSF162gp120のmRNAを用いた解析では、昆虫Sf細胞及び紫蚕由来の抽出液にお

いて、翻訳、糖鎖修飾活性が確認されたが、コントロールのウサギ網状赤血球、小麦胚芽由来の細胞抽出液にお

いては、翻訳活性は認められたが、昆虫細胞などのように糖鎖修飾活性は検出されなかった。

【0099】また、種々制御配列が異なるmRNAを用いた解析から（第5～12欄）、昆虫細胞抽出液においては、5'UTRにポリヘドリン由来の5'UTRを、シグナル配列としてcL由来の配列を用いた場合に翻訳、糖鎖修飾が行われる事が示された（第6、11欄）。また、3'UTRは、ポリヘドリン由来であるか、ウシ成長ホルモン由来であるかを問わず、糖鎖修飾が行わる。

【0100】一方、昆虫細胞抽出液において、5'UTRにBGH由来のものを用いた場合、及び、シグナル配列として、IL6シグナルを用いた場合には、翻訳のみ行われ、糖鎖修飾は行われなかった。このことから、5'UTR、シグナル配列が、糖鎖修飾の実行に重要であることが示された。

【0101】なお、コントロールのウサギ網状赤血球、小麦胚芽由来の細胞抽出液においては、用いたmRNAでは、糖鎖修飾は全く観察されなかった。

【0102】【実施例7】CHO細胞を用いた検討

哺乳動物細胞の細胞抽出液において、上記昆虫細胞と同

様に、翻訳及び糖鎖修飾活性を有するかを検討した。ここでは、哺乳動物細胞としてCHO細胞を用いて、上記昆虫細胞の細胞抽出液の調製条件と同様の方法で、CHO細胞抽出液を調製した。また、このCHO細胞の細胞抽出液の翻訳能などの解析にあたり、3種のmRNAを調製した。これらmRNAは、以下の表5に示す通り、（1）gp120（HIV-1 SF162由来）コード配列、ポリヘドリンUTR、gp120シグナル配列を有する第一のmRNA、（2）IL6コード配列、ポリヘドリンUTR、cLシグナル配列を備えた第二のmRNA、（3）IL6コード配列、哺乳動物用発現ベクターpRc/CMVのUTR、IL6のシグナル配列を備えた第三のmRNAである。

【0103】これら3種のmRNAを用いてCHO細胞抽出液の翻訳活性、糖鎖修飾活性を調べた。その結果を表5に示す。なお、陽性コントロールとして、翻訳、糖鎖修飾活性が確認された昆虫細胞（Sf細胞）の細胞抽出液における結果も同様に示す。

【0104】

【表5】

細胞抽出液	録型	録型タイプ	UTR	シグナル配列	翻訳	糖鎖付加
昆虫細胞	HIV-1 SF162のgp120	バキュロウイルス（昆虫）	ポリヘドリン	HIV-1 SF162のgp120	+++	+++
	ヒト型インターロイキン6	CHO細胞（哺乳類）	ポリヘドリン	ニワトリリゾチーム	+++	+++
			哺乳類用発現ベクターpRc/CMVのUTR	ヒト型インターロイキン6	++	++
CHO細胞	HIV-1 SF162のgp120	バキュロウイルス（昆虫）	ポリヘドリン	HIV-1 SF162のgp120	++	-
	ヒト型インターロイキン6	CHO細胞（哺乳類）	ポリヘドリン	ニワトリリゾチーム	++	-
			哺乳類用発現ベクターpRc/CMVのUTR	ヒト型インターロイキン6	+++	-

+:合成した -:合成しない

表5に示すように、CHO細胞抽出液では、いずれのmRNAにおいても翻訳活性が検出されたが、糖鎖修飾活性を確認することはできなかった。このようにCHO細胞の細胞抽出液では、糖鎖修飾活性を確認することはできなかったが、一方、上記ガス圧の変化による細胞破碎方法は、少なくとも哺乳動物細胞から翻訳活性を有する細胞抽出液を回収することができることは示された。

【0105】また、翻訳能を比較すると、pRc/CMVのUTRを用いた場合に、翻訳能が上昇していることが示された。このことは、細胞を調製した細胞の種類と、UTRが由来する細胞種とを対応させることができ、翻訳能の向上に重要であることが示された。

【0106】一方、陽性コントロールとして用いた昆虫細胞抽出液では、いずれのmRNAにおいても翻訳活

性、糖鎖修飾活性が確認された。特に、ポリヘドリンUTRを用いた場合に、翻訳活性、糖鎖修飾活性を向上させることができた。このことから、細胞抽出液を調製した細胞に感染能を有し、生育することができる生物由来のUTRは、その細胞抽出液を用いた翻訳及び糖鎖修飾を行わせるための制御配列として好適に利用することができることが示された。

【0107】[実施例8] CHO細胞抽出液と昆虫細胞(Sf細胞)抽出液との混合組成液

上述した通り、CHO細胞抽出液では、翻訳活性が検出されたが、糖鎖修飾活性については検出することができなかった。この糖鎖修飾活性を補足するためにCHO細胞抽出液と昆虫細胞抽出液とを種々の混合割合で混合した組成液を調製し、この組成液により翻訳活性、糖鎖修

A) IL6本来のシグナル配列使用

CHO細胞抽出液	10	9.9	9	5	0
昆虫細胞抽出液	0	0.1	1	5	10
pre-IL6	66	65	57	85	100
糖鎖付加IL6	0	0	4	43	95
シグナル切除されたIL6	0	0	3	6	33

B) IL6のシグナル配列をニワトリリゾームのシグナル配列で置換した

CHO細胞抽出液	10	9.9	9	1	0
昆虫細胞抽出液	0	0.1	1	9	10
pre-IL6	26	29	23	31	48
糖鎖付加IL6	0	2	11	61	100
シグナル切除されたIL6	0	0	2	13	32

図17及び表6に示すように、CHO-昆虫(9.9:0.1)組成液では、IL6蛋白質は検出されたが、糖鎖修飾されたIL6蛋白質は検出されず、糖鎖修飾活性が補足されていないことが示された。

【0110】一方、CHO-昆虫(9:1)組成液及びCHO-昆虫(5:5)組成液では、コントロールの昆虫細胞抽出液単独の場合に検出される糖鎖が付加されたIL6蛋白質バンドに対応した位置にバンドが検出され、糖鎖修飾が行われることが示された。

【0111】以上より、翻訳活性のみを有する細胞抽出液であっても、他の糖鎖修飾能を有する細胞抽出液を混合することにより、糖鎖修飾活性を補足することが可能となる。この結果は、ガス圧の変化により緩和な条件でCHO細胞の細胞抽出液を調製しているものの、この細胞抽出液中において、細胞が本来有する糖鎖修飾活性を担ういずれかの因子が不足し糖鎖修飾活性を奏しない

飾活性を検討した。

【0108】具体的には、上記検討に当たって、mRNAは、IL6由来又はニワトリリゾーム(cL)由来するシグナル配列を備えたIL6mRNA(実施例6におけるppIL6p, ppIL6B又はppCL6BからのmRNA)を使用した。これらmRNAを各組成液に添加し、この組成液の一部を電気泳動により分画し、分画後、抗IL6抗体を用いたウエスタンプロティングによりIL6蛋白質の同定及びその生成量を比較した。ウエスタンプロットティングの結果を図17に示し、デンシトメータでバンド強度を定量化した値を表6に示す。

【0109】

【表6】

が、この因子が昆虫細胞抽出液により補われ糖鎖修飾活性が補足されているという可能性が示唆される。

【0112】[実施例9] 応用

上述した実施例に示した昆虫細胞の抽出液及びこれを含む組成液では、翻訳及び糖鎖修飾さらにはプロセッシングをもインビトロで行えることが示された。また、この糖鎖修飾の効率を向上させ得る制御配列をも明らかになった。こうした細胞抽出液及び制御配列を備えた発現ベクターをパッケージ化することにより、インビトロの糖蛋白質合成キットを構成することができ、簡便にインビトロで糖蛋白質、プロセッシングされた蛋白質を合成させることができとなる。

【0113】また、上記CHO-昆虫組成液では、プロセッシングをも行わせることができたことから、この組成液は、翻訳後の蛋白質のプロセッシングを解析するためのモデル系としても役立つことが期待される。すなわ

ち、不活性ガスを用いた穏和な条件下で細胞破碎を行うことにより、糖鎖修飾などに関与する膜組織が保存された状態で無細胞抽出液が回収されたことが示唆された。従って、この細胞抽出液は、糖蛋白質などを合成する際に役立つだけでなく、翻訳により合成された蛋白質（又

は先駆体）が翻訳後にいかにプロセッシング等されるかを解析する際のモデル系としても役立ち得る。

【0114】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：52

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ゲノムDNA

起源

生物名：バキュロウイルス

配列の特徴

特徴を示す記号：5' UTR

配列

GGGAGTATT TACTGTTTC GTAACAGTT TGTAATAAAA AAACCTATAA AT 52

配列番号：2

配列の長さ：379

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ゲノムDNA

起源

生物名：バキュロウイルス

配列の特徴

特徴を示す記号：3' UTR

配列

AACACGATAC ATTGTTATTA GTACATTTAT TAAGCGCTAG ATTCTGTGCG TTGTTGATT 60

ACAGACAATT GTTGTACGTA TTTTAATAAT TCATTAATT TATAATCTT AGGGTGGTAT 120

GTTAGAGCGA AAATCAAATG ATTTTCAGCG TCTTTATATC TGAATTAAA TATTAATCC 180

TCAATAGATT TGTAAATAG GTTTCGATTA GTTCAAACA AGGGTTGTTT TTCCGAACCG 240

ATGGCTGGAC TATCTAATGG ATTTTCGCTC AACGCCACAA AACTTGCAA ATCTTGTAGC 300

AGCAATCTAG CTTTGTGAT ATTCTGTTGT GTTTGTTT GTAATAAGG TTCGACGTCG 360

TTCAAAATAT TATGCTGCA 379

配列番号：3

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TAATACGACT CACTATAGGG A 21

配列番号：4

配列の長さ：54

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ATG AGG TCT TTG CTA ATC TTG GTG CTT TGC TTC CTG CCC CTG GCT GCT CTG 51  
 Met Arg Ser Leu Leu Ile Leu Val Leu Cys Phe Leu Pro Leu Ala Ala Leu  
 5 10 15

GGG 54  
 Gly 18  
 配列番号：5  
 配列の長さ：84  
 配列の型：核酸  
 鎖の数：二本鎖  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：他の核酸 合成DNA  
 配列  
 ATG AAC TCC TTC TCC ACA AGC GCC TTC GGT CCA GTT GCC TCC TCC CTG GGG 51  
 Met Asn Ser Phe Ser Thr Ser Ala Phe Gly Pro Val Ala Phe Ser Leu Gly  
 5 10 15  
 CTG CTC CTG GTG TTG CCT GCT GCC TTC CCT GCC 84  
 Leu Leu Leu Val Leu Pro Ala Ala Phe Pro Ala  
 20 25

## 【0115】

【発明の効果】以上通り、本発明により、新たな細胞抽出液の調製が提供され、これにより細胞から翻訳及び糖修飾能を有する無細胞抽出液を簡便に回収することが可能となった。また、本発明の無細胞抽出液を使用することにより、例えば組み換え体蛋白質に、生物界に存在する所望の糖鎖を付加することが可能となる。

## 【図面の簡単な説明】

【図1】 本実施形態における翻訳装置の構成図である。

【図2】 実施例1におけるmRNA発現ベクターの構築方法を示す図である。

【図3】 実施例1における発現ベクターにより発現されるmRNAの構成図である。

【図4】 実施例4における細胞抽出液調製時のガス圧条件を検討した結果を図である。

【図5】 実施例4におけるmRNA添加量を検討した結果を示す図である。

【図6】 実施例4における好適な翻訳反応時間を検討した結果を示す図である。

【図7】 実施例4における好適な翻訳反応温度を検討した結果を示す図である。

【図8】 実施例4における酢酸マグネシウム濃度を検討した結果を示す図である。

【図9】 実施例4における酢酸カリウム濃度を検討し

た結果を示す図である。

【図10】 実施例4におけるスペルミジン濃度を検討した結果を示す図である。

【図11】 実施例4におけるGTP濃度を検討した結果を示す図である。

【図12】 実施例4におけるATP濃度を検討した結果を示す図である。

【図13】 実施例4におけるクレアチニナーゼ濃度を検討した結果を示す図である。

【図14】 実施例4における昆虫細胞抽出液を利用した翻訳産物をウエスタンブロッティングにより同定した結果を示す図である。

【図15】 実施例4における昆虫細胞、ウサギ網状赤血球、小麦胚芽の細胞抽出液による翻訳産物をウエスタンブロッティングにより検出した際の図である。

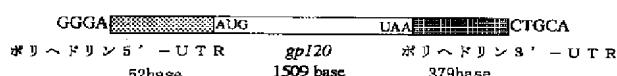
【図16】 実施例5における昆虫細胞抽出液による翻訳反応産物の脱糖鎖処理が行われた結果を示す図である。

【図17】 実施例8におけるCHO-昆虫組成液の翻訳、糖鎖修飾活性を解析した際のウエスタンブロッティングの結果を示す図である。

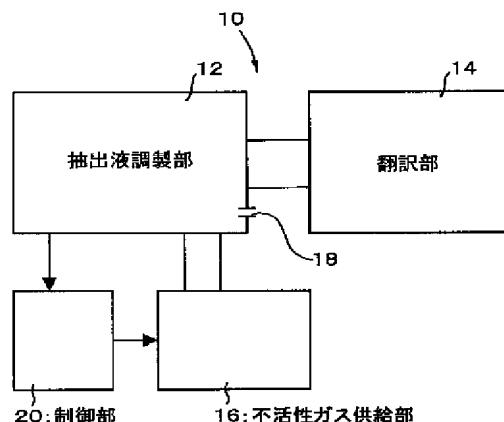
## 【符号の説明】

10 翻訳装置、12 抽出液調製部、14 翻訳部、16 不活性ガス供給部、18 排出口、20 制御部。

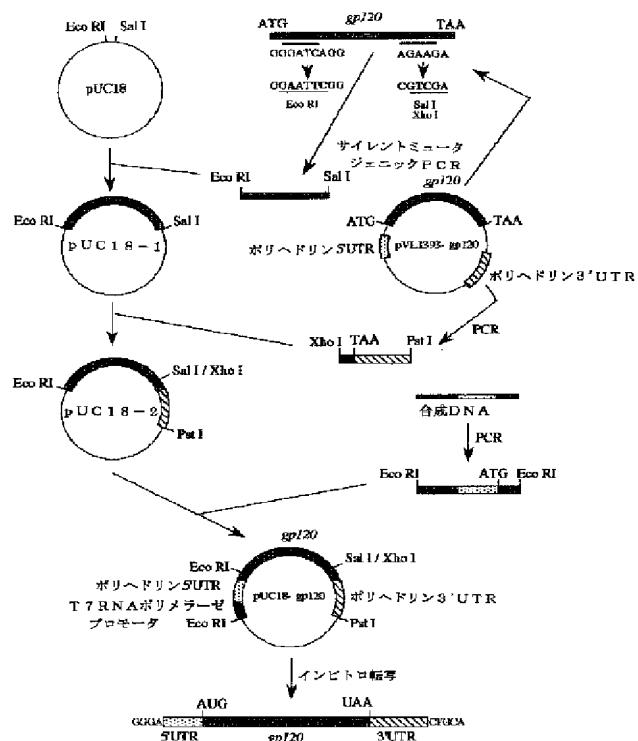
## 【図3】



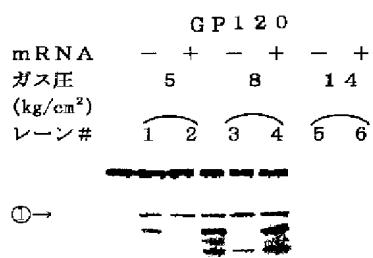
【図1】



【図2】



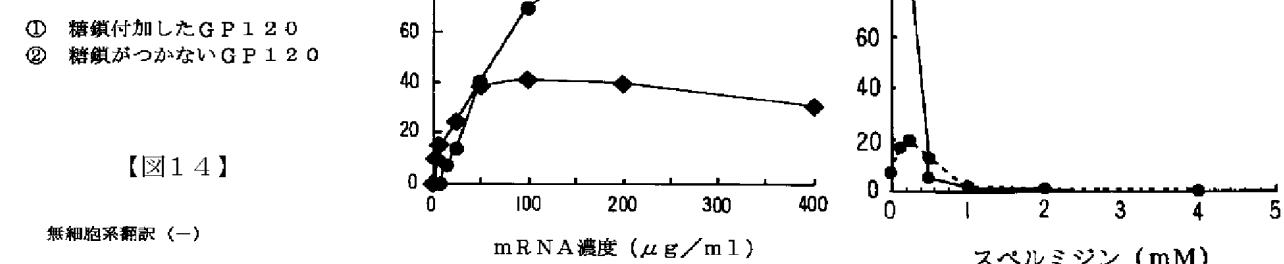
【図4】



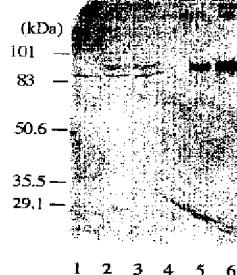
【図5】

① 糖鎖付加した G P 1 2 0  
② 糖鎖がつかない G P 1 2 0

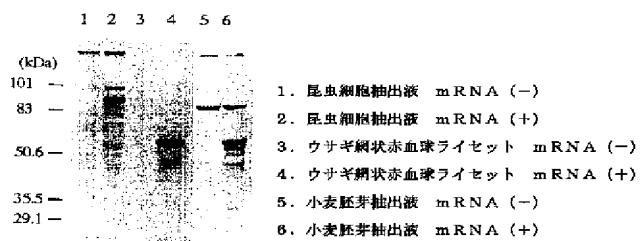
【図14】



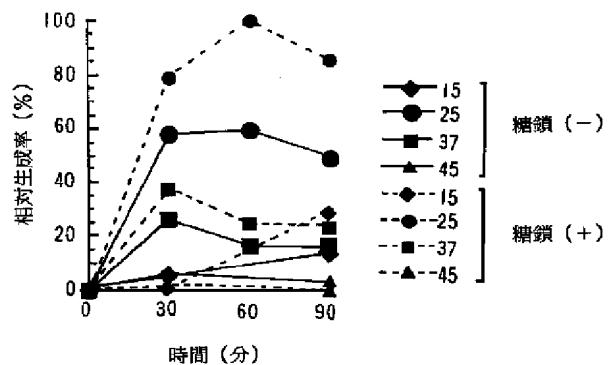
mRNA - + + (→) Sf21 cells 内で発現



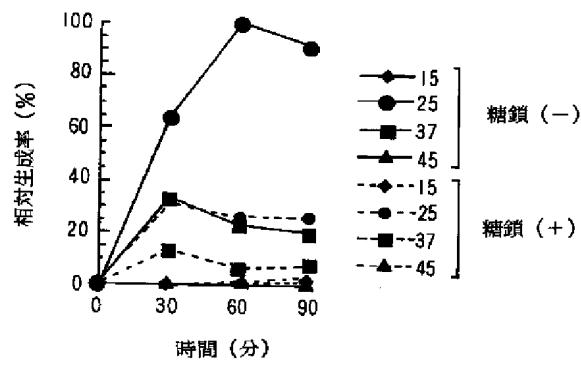
【図15】



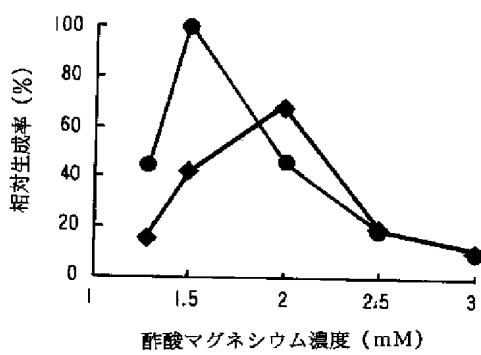
【図6】



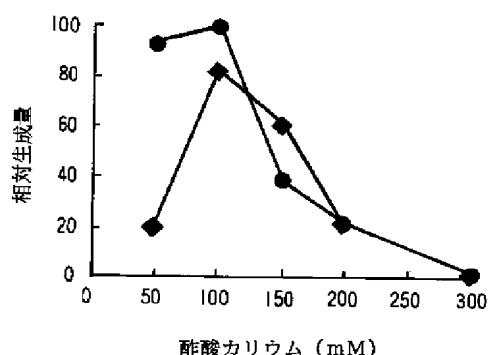
【図7】



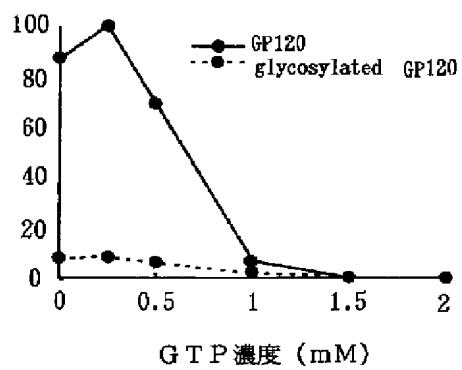
【図8】



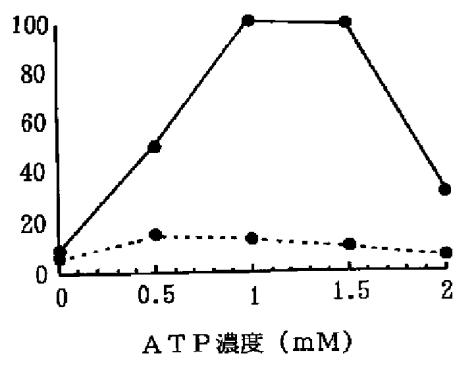
【図9】



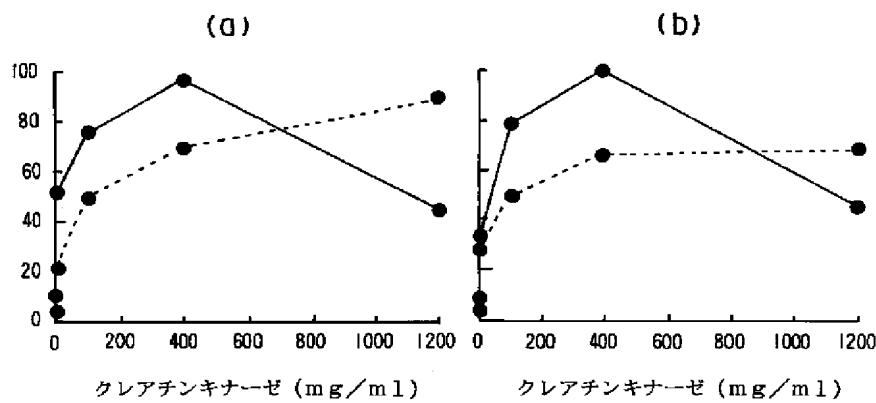
【図11】



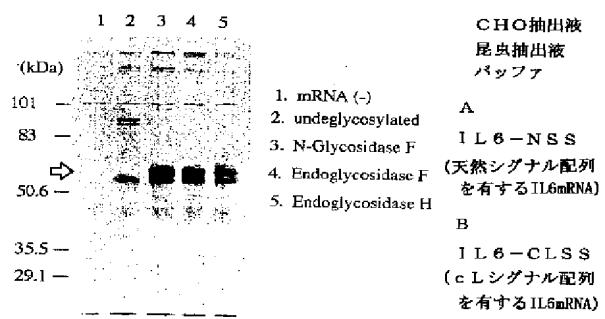
【図12】



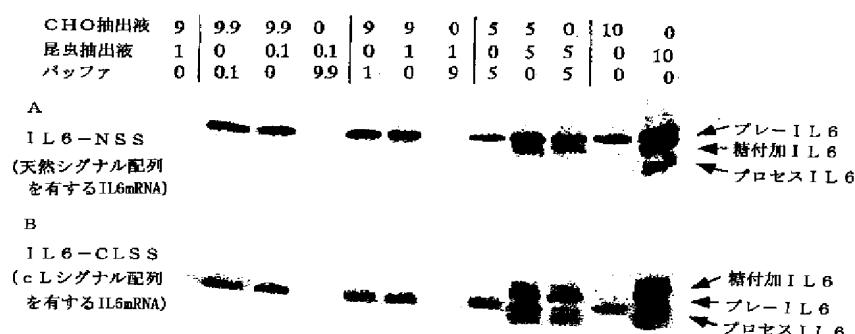
【図13】



【図16】



【図17】



フロントページの続き

Fターム(参考) 4B024 AA20 BA26 BA35 CA01 CA02  
 CA11 CA12 CA20 DA02 DA20  
 EA02 EA04 FA02 FA18 FA20  
 GA11 GA25 HA03 HA11  
 4B029 AA23 BB11 CC01  
 4B065 AA90X AA93Y AA97Y AA99X  
 AB10 AC14 AC20 BA01 BA30  
 BB01 BC01 BD14 BD50 CA26  
 CA60

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-325076  
(43)Date of publication of application : 28.11.2000

(51)Int.Cl. C12N 5/06  
C12M 1/33  
// C12N 15/09

(21)Application number : 11-141904 (71)Applicant : HARA TOSHIO  
(22)Date of filing : 21.05.1999 (72)Inventor : HARA TOSHIO  
TARUI HIROSHI

### (54) CELL-FREE EXTRACT AND GLYCOPROTEIN SYNTHETIC SYSTEM

#### (57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To prepare a cell extract having translation activities and sugar-modifying activities.

SOLUTION: Insect cells are stored in a small gas cylinder, and the small gas cylinder is charged with nitrogen gas to pressurize the cylinder. The charged gas is exhausted at once to crush the cells and to provide the objective cell extract. Not only a translation factor but also a factor carrying sugar-modifying activities can be recovered by the method, because the method is the one milder than the conventional cell-crushing method by using a homogenizer. As a result, an in-vitro glycoprotein synthesizing system capable of carrying out from the translation to the sugar-modification after the translation can be produced.

## \* NOTICES \*

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

CLAIMS

## [Claim(s)]

[Claim 1] A cell-free extract, wherein crush a cell and it is prepared, and it is a cell-free extract which has the activity which makes protein compound from mold nucleic acid, it makes said cell in atmosphere of inactive gas, and under application of pressure decompress and said cell is crushed.

[Claim 2] The cell-free extract according to claim 1, wherein said cell is an animal cell.

[Claim 3] The cell-free extract according to claim 1 or 2, wherein an inactive gas air current is supplied into atmosphere, it is pressurized and said inactive gas is discharged and decompressed out of atmosphere.

[Claim 4] The cell-free extract according to claim 1 to 3, wherein said inactive gas is nitrogen.

[Claim 5] Crush a cell which has protein synthesis activity and the sugar chain ornamentation activity which adds a sugar chain to compounded protein, and it is prepared, A cell-free extract, wherein it is a cell-free extract which can compound glycoprotein from mold nucleic acid, it makes said cell in atmosphere of inactive gas, and under application of pressure decompress so that protein synthesis activity and sugar ornamentation activity which said cell has may be saved and said cell is crushed.

[Claim 6] The cell-free extract according to claim 5, wherein said cell is of insect origin.

[Claim 7] The cell-free extract according to claim 5 or 6, wherein an inactive gas air current is supplied into atmosphere, it is pressurized and said inactive gas is discharged and decompressed out of atmosphere.

[Claim 8] The cell-free extract according to any one of claims 5 to 7, wherein said inactive gas is nitrogen.

[Claim 9] The cell-free extract according to any one of claims 5 to 8, wherein a pressure at the time of said application of pressure is 2 – 14 kgf/cm<sup>2</sup>.

[Claim 10] The cell-free extract according to any one of claims 5 to 9 crushing after said cell has been prepared by a 0.25 – 1.5x10<sup>8</sup> individual / ml.

[Claim 11] A constituent for acellular glycoprotein composition a cell-free extract indicated to claims 5-10 being added by cell-free extract which has the protein synthesis activity which compounds protein from mold nucleic acid, supplementing it with sugar ornamentation activity, and being able to compound glycoprotein from mold nucleic acid.

[Claim 12] The constituent for acellular glycoprotein composition according to claim 11, wherein a cell-free extract which has said protein synthesis activity is either of claims 1-4.

[Claim 13] A mRNA synthesizing means which makes DNA to mRNA which encoded protein by which sugar chain ornamentation may be carried out transfer, A glycoprotein synthesizing means which can compound glycoprotein from mRNA compounded by mRNA synthesizing means including the cell-free extract according to claim 5, A glycoprotein synthesizing system with which glycoprotein sugar chain ornamentation was carried out [ glycoprotein ] by said glycoprotein synthesizing means is compounded based on mRNA transferred by a preparation and said mRNA synthesizing means from DNA.

[Claim 14] DNA which encoded said protein by which sugar chain ornamentation may be carried

out is inserted downstream from a promoter, is further provided with an expression vector which makes mRNA reveal from said DNA, and it to said expression vector. It is the arrangement which an untranslation region is made to add to mRNA compounded by manifestation from said promoter, The glycoprotein synthesizing system according to claim 13, wherein it has untranslation region arrangement which is of proteinic gene origin by which sugar chain ornamentation may be carried out by intracellular [ which was used for preparation of said cell-free extract ].

[Claim 15]The glycoprotein synthesizing system according to claim 14, wherein said cell is an insect cell and a promoter in said expression vector and an untranslation region are of virus origin which makes said insect cell a host.

[Claim 16]The acellular glycoprotein synthesizing system according to claim 15, wherein said virus is a baculovirus and said promoter and untranslation region arrangement are of the Pori Hedrin origin of a baculovirus.

[Claim 17]Glycoprotein generated using the cell-free extract according to any one of claims 5 to 10.

[Claim 18]A device characterized by comprising the following for manufacturing a cell-free extract which crushes a cell which has protein synthesis activity and can compound protein from mold nucleic acid.

A container which accommodates said cell.

A gas supplying section filled up with inactive gas in said container, and a pressure control section made to decompress after pressurizing a pressure in said container so that a cell in said container can be crushed, where protein synthesis activity which said cell has is held.

[Claim 19]So that a cell in said container can be crushed, after it has the sugar chain ornamentation activity which said cell makes a sugar chain add to protein compounded further and said pressure control section has held protein synthesis activity and sugar chain ornamentation activity which said cell has, The cell extract manufacturing installation according to claim 18 characterized by making it decompress after pressurizing a pressure in said container.

---

[Translation done.]

## \* NOTICES \*

JPO and INPIT are not responsible for any  
damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

## DETAILED DESCRIPTION

### [Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the system which performs especially both protein synthesis and subsequent sugar chain ornamentation by a cell extract, and can compound glycoprotein about the in vitro translation system which makes protein compound out of a cell using a cell extract.

[0002]

[Description of the Prior Art] Function data in the living body are recorded on nucleic acid, by using this nucleic acid as a mold, the protein which is a functional molecule is translated or a functional RNA molecule (for example, ribozyme) is transferred. In recent years, analysis of the nucleic acid which supported such a vital function, and protein is advanced briskly, and, on the other hand, development of the analyzing method of these nucleic acid and protein and the analysis means is also furthered.

[0003] Especially the analyzing method of nucleic acid developed splendidly by development of a polymerase chain amplification method (PCR) etc. According to this PCR, it becomes possible to make the DNA fragment to this template DNA amplify free by adding a primer and template DNA in the acellular reaction mixture containing polymerase enzyme. That is, about nucleic acid, it is possible to make it compound and amplify free out of a cell. For example, the determination of the primary structure (base sequence), etc. are presented with the nucleic acid compounded here, and it has come [ and ] to make advance of nucleic acid analyses, such as genomics, accelerate by this.

[0004] On the other hand, also in the proteinic analyzing method, since the in-vitro proteinsynthesis system which used the Escherichia coli extract by A.S.Spirin and others (Science, 242, 1162-1164 (1988)) was developed, various cell-free translation systems have been developed. There are some which used the cell extract prepared from a wheat germ, rabbit reticulocyte, etc. besides the system of the above-mentioned Escherichia coli as such a cell-free translation system, for example.

[0005] Among these, the cell-free translation system of more general wheat germ origin mashes a wheat germ using a mortar etc. with a glass bead, and makes protein compound from mRNA using the cell extract obtained from this mashed wheat germ. That is, it is possible to collect cell extracts from a wheat germ and to make protein compound free out of a cell using this, holding the protein synthesis (translation) activity which exists in this wheat germ.

[0006] Thus, the complicated factor and complicatedness at the time of making protein compound in a cell, if protein can be made to compound free out of a cell are eliminated, and it becomes possible to obtain desired protein simple, and it becomes advantageous when conducting proteinic analysis etc. From such a viewpoint, from before, improvement of the cell-free translation system, etc. are made and such art is indicated by the Patent Publication Heisei No. 503119 [ one to ] gazette, JP,4-200390,A, JP,7-203984,A, etc., for example. In such a cell-free translation system, Amasham etc. are marketed also as a kit, and it is large and available.

[0007]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] However, although it is possible in the above-mentioned conventional cell-free translation system to perform translation in protein, there is a problem that posttranslational modification of the translated protein cannot be performed. That is, in intracellular, proteinic [ many of ] is translated as protein based on mRNA transferred from mold nucleic acid, and receiving ornamentation after this translation is known. There is sugar chain ornamentation as one of the ornamentation after this translation.

[0008] It is thought that the sugar chain added by the sugar chain ornamentation after this translation is functioning as protein's own functional regulator, or protection of protein and a stabilizing factor as the signal and ligand which participate in the recognition and adhesion between substances and between cells. Therefore, in order to analyze a function in the living body about the protein which receives sugar chain ornamentation, it is necessary to acquire the protein which received sugar chain ornamentation.

[0009] Although this sugar chain ornamentation makes a sugar chain add to proteinic specific amino acid, since various those sugar chain ornamentation reactions differ and are complicated, it is not an easy thing to make a sugar chain add to the protein compounded by the above-mentioned cell-free translation system chemically.

[0010] A biochemical method, i.e., the method of making a sugar chain add to protein using intracellular sugar chain ornamentation activity using a cell extract like a cell-free translation system, is examined from such a problem, and the extract which has the sugar chain ornamentation activity of dog organization origin is acquired. This is prepared by collecting the microsome fractions which crush the organization of a dog with a homogenizer and contain a Golgi

body by ultra-centrifugal separation.

[0011]The extract of this dog organization is used apart from the conventional cell-free translation system. After specifically compounding protein by a cell-free translation system and collecting these compound protein, synthetic protein is moved in the extract of said dog organization, and sugar chain ornamentation is performed. Thus, since the extract of the dog organization was acquired, it became compoundable [ glycoprotein ] biologically out of the cell. And it is expectable to conduct analysis in which the reaction in intracellular was made to reflect more as compared with the protein in which sugar chain ornamentation compounded by the conventional cell-free translation system is not performed by using the glycoprotein compounded here for proteinic performance analysis etc.

[0012]However, in composition of glycoprotein using the conventional dog tissue extract, by a cell-free translation system, the protein which made protein compound will be collected and sugar chain ornamentation will be carried out after that. Thus, when compounding glycoprotein, using independently a cell-free translation system and a sugar chain ornamentation system passes through such two or more processes undesirably in the protein which generally denaturalizes easily, it is also considered that the protein used as the foundation denaturalizes and brings about an activity fall. Attentiveness advanced also for the operator who operates the protein which denaturalizes easily etc. are required, and it becomes complicated work in compounding glycoprotein in addition to the physical influence on protein, to prepare two steps of above systems and to make glycoprotein compound in two steps using this.

[0013]Also about the cell extract which can perform sugar chain ornamentation, it is only usable and the thing of the organization origin limited like a dog organization at present has not come to collect sugar chain ornamentation activity from a universal tissue cell. It is expected that the kind of sugar chain changes with cell strains, and a sugar chain ornamentation reaction changes with cell strains from this. Therefore, if it becomes possible to collect sugar chain ornamentation activity from various cells, it will also become possible to design proteinic sugar chain ornamentation free.

[0014]in the medicinal field, although various protein pharmaceutical preparation is developed, about the effect of this protein pharmaceutical preparation, being influenced by the existence of the sugar chain of the protein used as that ingredient, the kind, etc. is known for recent years. Therefore, if the sugar chain ornamentation activity from a cell is variously recoverable, contributing to development of such protein pharmaceutical preparation, improvement, etc. greatly is expected.

[0015]Then, invention-in-this-application persons inquire wholeheartedly in view of an aforementioned problem about preparation of the cell extract which can perform a series of processes from protein synthesis to sugar chain ornamentation within one system, and it lets this research pass, Preparation of a different new cell-free extract from preparation of the conventional cell-free translation system was enabled, and it made it possible to perform a series of processes from protein synthesis to sugar chain ornamentation within one system using this extract.

[0016]

[Means for Solving the Problem]As a result of invention-in-this-application persons' considering preparation of a cell extract as above-mentioned, preparation of the following cell extracts was enabled. Preparation of a cell extract of this invention makes a cell crush by a means [ \*\*\*\* ] to change a pressure of environment which surrounds a cell to decompression from application of pressure, and also makes sugar chain ornamentation activity specifically collect further protein synthesis activity which a cell has at least in a cell extract.

[0017]That is, a cell-free extract of this invention crushes a cell, and is prepared, are a cell-free extract which has the activity which makes protein compound from mold nucleic acid, said cell in atmosphere of inactive gas and under application of pressure is made to decompress, and said cell is crushed.

[0018]According to the above-mentioned invention, a cell is not mashed like a homogenizer like before, but a cell is crushed or burst by pressure variation, and it is prepared. Thus, by making a cell crush by pressure variation, as compared with a crushing method like the conventional homogenizer, it becomes possible to make a cell crush on conditions [ \*\*\*\* ], and it becomes possible to reduce influence of an organ on intracellular, etc.

[0019]A cell-free extract of this invention crushes a cell which has protein synthesis activity and the sugar chain ornamentation activity which adds a sugar chain to compounded protein, and is prepared, Are a cell-free extract which can compound glycoprotein from mold nucleic acid, said cell in atmosphere of inactive gas and under application of pressure is made to decompress so that protein synthesis activity and sugar ornamentation activity which said cell has may be saved, and said cell is crushed.

[0020]Thus, according to this invention, a cell extract holding both activity is prepared by making a cell which has protein synthesis (translation) activity and sugar chain ornamentation activity crush by pressure variation which does not destroy these both activity. It can make as a system having a cell-free translation system currently prepared independently thereby conventionally and a sugar chain ornamentation system, and it becomes possible by using this system to perform protein synthesis and sugar chain ornamentation by one cell extract.

[0021]This invention provides a constituent for acellular glycoprotein composition. This constituent for acellular glycoprotein composition adds a cell extract which has the above-mentioned sugar chain ornamentation activity to a cell extract which has protein synthesis activity, and is constituted. Thus, it can supplement with sugar chain ornamentation activity, and a constituent which also has sugar chain ornamentation activity with protein synthesis activity can be made to constitute by adding to a cell extract which has only protein synthesis activity for a cell extract which has sugar chain ornamentation activity by itself.

[0022]This invention provides a glycoprotein synthesizing system. A mRNA synthesizing means which makes DNA

to mRNA which encoded protein in which sugar chain ornamentation of this glycoprotein synthesizing system may be carried out transfer. A glycoprotein synthesizing means which can compound glycoprotein from mRNA compounded by mRNA synthesizing means with a cell-free extract or a constituent which has the above-mentioned protein synthesis activity and sugar chain activity, Based on mRNA transferred by a preparation and said mRNA synthesizing means from DNA, glycoprotein sugar chain ornamentation was carried out [ glycoprotein ] by said glycoprotein synthesizing means is compounded.

[0023]If even template DNA is prepared according to this system, it will become possible from this template DNA to make glycoprotein compound simple via mRNA.

[0024]The above-mentioned glycoprotein synthesizing system can be equipped with an expression vector which makes DNA which encoded further said protein by which sugar chain ornamentation may be carried out insert downstream from a promoter, and makes mRNA reveal from said DNA. Thus, it becomes possible by having an expression vector further to make glycoprotein compound simple by, starting an interested gene in a genome for example, and connecting with this expression vector.

[0025]The above-mentioned expression vector is equipped with untranslation region arrangement which is the arrangement to which mRNA compounded by manifestation from said promoter is made to add an untranslation region, and is of proteinic gene origin by which sugar chain ornamentation may be carried out by intracellular [ which was used for preparation of said cell-free extract ]. Thus, by having an untranslation region of a gene which generates glycoprotein by intracellular [ concerned ], it becomes possible to raise efficiency of sugar chain ornamentation to synthetic protein.

[0026]If a cell-free extract by above-mentioned this invention, a constituent, and a glycoprotein synthesizing system are used, since glycoprotein is generable simple, it becomes possible to conduct intracellular performance analysis using glycoprotein easily.

[0027]Furthermore, this invention provides a cell-free extract manufacturing installation. This cell-free extract manufacturing installation is provided with the following.

A container which is a device for manufacturing a cell-free extract which crushes a cell which has protein synthesis activity and can compound protein from mold nucleic acid, and accommodates said cell.

A gas supplying section filled up with inactive gas in said container.

A pressure control section made to decompress after pressurizing a pressure in said container so that a cell in said container can be crushed, where protein synthesis activity which said cell has is held.

[0028]The above-mentioned cell-free extract manufacturing installation has the sugar chain ornamentation activity to which said cell makes protein compounded further add a sugar chain, Said pressure control section changes a pressure in said container from a pressurization state to a reduced pressure state so that a cell in said container can be crushed, where protein synthesis activity and sugar chain ornamentation activity which said cell has are held.

[0029]If these cell-free extract manufacturing installation is used, it will become possible to manufacture a cell extract which has protein synthesis activity, or a cell extract which also has sugar chain ornamentation activity further simple.

[0030]

[Embodiment of the Invention]Hereafter, it explains using the suitable embodiment of this invention.

[0031][Preparation of a cell-free extract] By decompressing the pressure of the cell in the atmosphere of inactive gas, and under application of pressure, a cell-free extract crushes a cell and is prepared.

[0032]If it is a cell which has the translational activity which makes protein compound from mold nucleic acid, and the sugar chain ornamentation activity which performs sugar chain ornamentation after translation, what kind of cell may be sufficient as the cell which can be used for preparation of the above-mentioned cell-free extract, and it can be widely included from a prokaryotic cell to an eukaryotic cell. For example, cells, such as the mammals, birds, reptiles, an amphibian, fishes, vegetation, and a microorganism, are mentioned. And the cell which can collect translational activity among such broad cells can adopt a mammalian cell, an insect cell, etc. suitably. When collecting translational activity and sugar chain ornamentation activity, an insect cell etc. can be used conveniently. The cell which is under organization or was extracted from the organization may be sufficient as these cells, and they may be cultured cells.

[0033]While the above-mentioned cell crushes, it is arranged in the atmosphere of inactive gas. This inactive gas is used so that the extract after cell crushing may contact air and may not affect translational activity etc. Therefore, if this purpose can be attained, there is no limitation in the kind of inactive gas, for example, nitrogen gas, argon gas, etc. can be used.

[0034]A cell strain can determine suitably the pressure at the time of the application of pressure at the time of crushing the above-mentioned cell. This pressure can determine the translational activity of the extract eventually extracted in the periphery of the cell to be used in consideration of the resistance to pressure etc. of the factor which participates in the ornamentation after the intensity of a wrap film, a wall, etc., internal translation, and translation as an index. For example, in the case of the cell of insect origin, it can be considered as 2 - 14 kgf/cm<sup>2</sup>, and it can be considered as 5 - 8 kgf/cm<sup>2</sup>, and can be more preferably considered as 8 kgf/cm<sup>2</sup> still more preferably. In the case of a CHO cell, it is preferred that it is a pressure comparatively higher than an insect cell, and it can specifically be considered as 2 - 32 kgf/cm<sup>2</sup>.

[0035] Each cell strain can also determine application-of-pressure time suitably. Translational activity of the extract eventually prepared in the periphery of the cell to be used in consideration of the resistance to pressure etc. of the factor which participates in the ornamentation after the intensity of a wrap film, a wall, etc., internal translation, and translation can be made into an index in this determination. For example, in the case of the cell of insect origin, it can be preferably made still more desirable for 60 to 90 minutes for 120 minutes from 30 for 3 to 120 minutes.

[0036] The decompression after application of pressure should just decrease a pressure rapidly so that a cell can be crushed, and the pressure in the after-decompression case can lengthen an ordinary pressure grade or a pressure mechanically, and can also make it a pressure still lower than ordinary pressure.

[0037] Supply and discharge of gas into the atmosphere in which the cell was accommodated, or the curtailment of volume in which a cell is accommodated and extension can perform pressure variation from the above-mentioned pressurization state to a reduced pressure state. When based on supply and discharge of the former gas here, the above-mentioned inactive gas can be conveniently used as this gas.

[0038] Eventually, a cell-free extract is prepared by collecting the extracts after cell crushing. It is used mainly in the meaning distinguished from survival intracellular cell sap, and, this cell-free extract, the existence of mixture of the cell residue after the above-mentioned crushing does not ask. Therefore, after the cell extract after the above-mentioned crushing removes the residue of the cell crushed as a state where residue exists, if needed by centrifugal separation etc., it can be made into a cell-free extract.

[0039] Although the thing of specific cell origin can also be alone used for the cell-free extract prepared here, Although it has protein synthesis activity depending on the single use of the extract of specific cell origin, when sugar chain ornamentation activity is low or does not demonstrate, it can add the cell-free extract of other cell origin which has sugar chain ornamentation activity at a suitable rate, and can make it supplement with sugar chain ornamentation activity. For example, although it has protein synthesis activity depending on single use, when not demonstrating sugar chain ornamentation activity, it can add suitably the cell-free extract etc. which also have the sugar chain ornamentation activity of insect cell origin, and can also make it supplement with sugar chain ornamentation activity like the cell-free extract of CHO cell origin.

[0040] [Glycoprotein synthesizing system] Next, the mold nucleic acid which serves as a substrate of a line sake in translation and sugar chain ornamentation is explained using the above-mentioned cell-free extract.

[0041] In 1 and expression vector protein synthesis (translation), mRNA is needed as that mold, and DNA is needed for this mRNA generation (transfer) as that mold. Here, the expression vector containing the template DNA used as the foundation of this mRNA composition is explained.

[0042] In order to compound mRNA used as the foundation of protein synthesis, the arrangement of the request which encoded protein is inserted in an expression vector. Although there is no limitation in particular, since the above-mentioned cell-free extract can also perform sugar chain ornamentation after protein synthesis, as this protein coding sequence, the arrangement which encoded the protein by which sugar chain ornamentation may be carried out can be conveniently used for this protein coding sequence.

[0043] In the above-mentioned expression vector, it has a promoter who makes transfer start upstream of the arrangement which encoded the above-mentioned protein. As this promoter, although there is no limitation in particular, in order to compound mRNA of a single strand, various RNA polymerase promoters can be used conveniently. As the example, T7 RNA-polymerase promoter, T3 RNA polymerase, SP6 RNA polymerase, etc. are mentioned.

[0044] To an expression vector, to insert the above-mentioned protein coding sequence, the both ends are adjoined, it has 3' untranslation region (UTR) arrangement, and 5' and when these arrangement is compounded as mRNA, it is added to the both ends of mRNA as UTR, and controls translation. Since this UTR arrangement functions as a control array when it makes it translate using a cell-free extract, As for this arrangement, it is preferred to choose according to the cell used for preparation of a cell-free extract, for example, UTR originating in the virus infected with UTR or such a cell of the cell origin concerned, phage, etc. can be used.

[0045] For example, when an insect cell is used for preparation of the above-mentioned cell-free extract, as this UTR, UTR originating in the virus which has infection ability in UTR or the insect cell of insect cell origin, for example, a baculovirus etc., can be used.

[0046] To the above-mentioned expression vector, it is preferred to make self-renewal ability hold. Such self-renewal ability can use the self-renewal ability which various plasmids, a viral DNA, etc. have. These can be suitably chosen according to the host for making the manifestation by the host or this vector for making this expression vector amplify perform. For example, when choosing Escherichia coli as a host, a pUC system and a pBR system plasmid can be used as an expression vector. When making a mammalian cell into a host, viral DNAs, such as SV40, etc. can be used suitably. If required, it can also constitute as a shuttle vector which has self-renewal ability in the host from whom even a preparation differs two or more self-renewal ability.

[0047] In order to make mRNA compound using 2 and the synthetic above-mentioned expression vector of mRNA, transcription factors, such as RNA polymerase, are needed. The transcription factor which a survival cell holds can be used for such a transcription factor. That is, the above-mentioned expression vector can be introduced into this survival intracellular, and mRNA can be made to compound using an intracellular transcription factor. The target mRNA is prepared by carrying out separation refinement of the mRNA compounded here from other intracellular mRNA(s) in accordance with a known method.

[0048] When an intracellular transcription factor is used as mentioned above, it is necessary to refine the target

mRNA from intracellular countless mRNA, but. In order to simplify such mRNA refining operation, this transcription factor can use the extract which has the transcriptional activity extracted from the cell, and an in vitro transfer system. As an in vitro transfer system, the transfer system of reaction of T7 phage origin, the transfer system of reaction of Escherichia coli origin, etc. can be illustrated, for example. mRNA composition using this system can be carried out using a commercial kit (Ambion), for example, MEGAscript<sup>TM</sup>, RiboMAX<sup>TM</sup> (Promega), etc.

[0049]Thus, when mRNA is compounded by in vitro one (transfer process), it becomes possible to perform a series of processes to the protein synthesis (translation) later mentioned from a mRNA composition (transfer) process, and a subsequent sugar chain ornamentation process in the outside of a cell, i.e., in vitro one.

[0050]3, translation of protein, sugar chain ornamentation in vitro translation, and a sugar chain ornamentation reaction can be performed by adding the above-mentioned mRNA to the cell-free extract which has the above-mentioned protein synthesis activity and sugar chain ornamentation activity fundamentally. That is, since it has the translational activity which carries out protein synthesis, and the sugar chain ornamentation activity after this translation, protein is compounded by addition of mRNA to the above-mentioned acellular extraction system from the mRNA concerned, after that, to the above-mentioned acellular extraction system, sugar chain ornamentation to this protein is carried out, and glycoprotein is compounded.

[0051]In compounding glycoprotein in the above, magnesium acetate, potassium acetate, spermidine, GTP, ATP, creatine kinase, a buffer, etc. can be added to a cell extract, and a cell extract can be prepared. In the cell extract of an insect cell as an example, The last concentration 10.6 mM HEPES-KOH (pH 7.95), 1.3mM magnesium acetate, It can prepare to 100mM potassium acetate, 2.5mM DTT, 0.25mM spermidine, 444 microg /ml ] creatine kinase, 8.0mM phosphoric acid creatine, 1.2mM ATP, and 0.25mM GTP, and a translation reaction can be presented. It is suitable for a cell extract to add amino acid mixed liquor. This mixed liquor can be added, for example so that final concentration may turn into a 25microM grade.

[0052]Although it is necessary in protein synthesis to add mRNA to a cell extract, this addition can be added so that it can be considered as the same addition as the conventional in vitro translation system, for example, may become 200 microg/ml final concentration to a cell extract. The protein compounded by such a method can use this synthetic protein (or glycoprotein) for the various purposes, after being isolated from a cell extract if needed.

[0053][Translation device] From preparation of the above-mentioned cell extract to proteinic (\*\*\*\* white matter) composition may be automated. Such a device can be constituted as follows.

[0054]The extract preparation part 12 for the translation device 10 to prepare a cell-free extract from a cell and the translating part 14 to which protein synthesis is made to perform using this extract are formed.

[0055]A cell is accommodated in an inside, a cell is crushed by this inside, and, as for this extract preparation part 12, an extract is prepared. Crushing of this cell is performed by the pressure variation inside the extract preparation part 12. In order to perform this pressure variation, inactive gas is accommodated in the extract preparation part 12, and the inactive gas feed zone 16 for supplying inactive gas to said extract preparation part is formed in it. That is, by sending inactive gas into the extract preparation part 12, this inactive gas feed zone 16 raises the pressure inside the preparation part 12, and applies a pressure to the accommodated cell. The inactive gas supplied from this inactive gas feed zone 16 prevents the extract after cell crushing from contacting air (oxygen), and prevents the various activity falls in an extract.

[0056]The outlet 18 for discharging the sent-in inactive gas, making the pressure inside the preparation part 12 decompress, and making a cell crush (burst) is formed in the above-mentioned extract preparation part 12.

[0057]In order to control pressure variation by the feed of the inactive gas to these extract preparation part 12, and its discharge, the extract preparation part 12 is equipped with the control section 20. This control section 20 enables control according to the intensity etc. of the film which covers a cell, and the wall, and makes protein synthesis activity and sugar chain ornamentation activity collect in the cell extract after cell crushing.

[0058]On the other hand, the translating part 14 is connected to said extract preparation part 12 so that supply of the extract prepared in the above-mentioned extract preparation part may be attained. The inside of this translating part 14 is equipped with a reaction vessel although not shown in drawing 1, and said extract is poured into this reaction vessel. This translating part 14 is equipped with a sample injection section, and mRNA which serves as a substrate of protein synthesis by this sample injection section is poured into a reaction vessel.

[0059]According to the above-mentioned translation device 10, by supplying a cell to the extract preparation part 12, a cell is crushed in the extract preparation part 12, and a cell extract is prepared. And the cell extract prepared here is supplied in a reaction vessel in the translating part 14, mRNA is added by this, and composition of glycoprotein is performed.

[0060]As long as it is required, it may have a transfer section which makes mRNA generate from an expression vector, and mRNA supplied to a translation device in this transfer section may be made to generate in the above-mentioned translation device. Thus, when it has a transfer section, it becomes possible from an expression vector to make a series of processes to composition of glycoprotein automate via mRNA.

[0061]

[Example]Hereafter, although an example explains this invention concretely, this invention is not limited to these examples.

[0062][Example 1] In vitro composition of this glycoprotein was tried using GP120 of HIV (human immunodeficiency virus) as protein in which he is known [ which is done for preparation sugar chain ornamentation ] about the expression vector. The expression vector which makes this gp120mRNA reveal was built in composition of this glycoprotein as follows. The composition of gp120mRNA provided with Pori Hedrin UTR typically revealed by

drawing 3 from \*\*\*\*\* KUTA in the constructing method of an expression vector was shown in drawing 2. The base sequence of this Pori Hedrin 5'-UTR is shown in the array number 1, and the base sequence of 3'-UTR is shown in the array number 2 (Robert, D. et al., Virology 185, and 229-241 (1991)).

[0063] Point mutation was inserted for pVL1393-gp120 plasmid by PCR, and the recognition site of EcoRI and SalI was made to form in the both ends of gp120 first in drawing 2. EcoRI and a SalI restriction enzyme cut the plasmid after this variation insertion, and the gp120' fragment which both ends lack a little was isolated. On the other hand, EcoRI and a SalI restriction enzyme cut similarly plasmid pUC18 used as the skeleton of an expression vector, it inserted there the above-mentioned gp120' fragment, and set it to pUC18-1.

[0064] Next, two primers which have XhoI or SalI at the end are used. The remaining arrangement of an end and 3'3' UTR arrangement of gp120 were made to amplify from pVL1393-gp120 plasmid by PCR, this amplification fragment was inserted in the SalI part of pUC18-1, and this was set to pUC18-2.

[0065] Composition generated the remaining arrangement of 5' end of gp120, and 5'UTR arrangement, and they added T7 RNA-polymerase promoter array number 3 upstream of 5'UTR on the occasion of this composition. An EcoRI part is inserted in those both ends at PCR, and this synthetic fragment made this fragment insert in the EcoRI part of pUC18-2. pUC18-gp120 plasmid by which gp120 expression cassette including UTR arrangement was inserted by this downstream from T7 RNA-polymerase promoter arrangement was generated.

[0066] This pUC18-gp120 plasmid was made to transfer in in vitro one using MEGAscript<sup>TM</sup> (Ambion), and gp120mRNA shown in drawing 3 was prepared. Hereafter, the various examination in composition of glycoprotein was performed by using this gp120mRNA as a mold.

[0067](1) In preparation of the influence cell extract of a cell number. It carried out using insect cell Sf21 cell (J. L. Vaughn, R. H. Goodwin, G. L. Tompkins, and P. McCawley, In Vitro, 13, and 213-217 (1977)). The cell suspension of cell concentration in which Sf21 cells differ was put in in the mini cylinder (MINI-BOMB CELLDISRUPTION CHAMBER (made by KONTES)), respectively, and it processed for 30 minutes by nitrogen gas pressure 8 kgf/cm<sup>2</sup>. By centrifugal separation (product [ made by BECKMAN ] L7Ultracentrifuge 55 type, a rotor SW40Ti rotor, 14000rpmx15min), the cell extract was obtained for each cell sap after this processing.

[0068] Translation ability was investigated using the cell extract prepared above. In order to analyze translation ability, the above-mentioned gp120mRNA was added to the cell extract so that it might become the 200 microg/ml last concentration, and the translation reaction was performed. Under [ a fixed quantity / in two methods / protein / after a reaction ]. One is the way avidin detects the amount of incorporation to the translation product of biotin sign lysine tRNA. The method of detecting a translation product with the western blotting method which used the antibody of GP120, and quantifying the detected product by Densitrometer (FastScan, product made by Molecular Dynamics) was used for other methods. These assays estimated translation ability. The result is shown in Table 1.

[0069]

[Table 1]

#### 細胞数の影響

細胞密度 (10 <sup>8</sup> cells/ml)			
	1.5	1.0	0.5
翻訳能 (%)	91	100	44
			1.7

As shown in Table 1, in order that a cell extract might maintain translation ability, the desirable cell number was the range of a 0.25 - 2.5x10<sup>8</sup> individual / ml, and its cell number of a 1.0x10<sup>8</sup> individual / ml was especially the optimal.

[0070](2) The influence which exerts the nitrogen gas pressure in the influence mini cylinder of a nitrogen gas pressure on translation ability in the range of 2 - 14 kgf/cm<sup>2</sup> was considered like the above. Setting the cell number to preferred cell number 1.0x10<sup>8</sup> individual / ml in the above, nitrogen gas processing time was set up in 30 minutes, and crushed the cell. To the obtained cell extract, gp120mRNA was added so that it might become the 200 microg/ml last concentration, and the translation reaction was performed. Translation ability was compared from the amount of protein synthesis under each gas pressure conditions. The result is shown in Table 2.

[0071]

[Table 2]

#### 窒素ガス圧の影響

窒素ガス圧 (kg/cm <sup>2</sup> )		
	5	8
翻訳能 (%)	99	100
		64

As shown in Table 2, a nitrogen gas pressure can be made into the range of 2 - 14 kgf/cm<sup>2</sup>, and can be preferably made into the range of 5 - 8 kgf/cm<sup>2</sup>. The nitrogen gas pressure was 8 kgf/cm<sup>2</sup> the optimal.

[0072] The fractionation pattern at the time of carrying out fractionation of the protein which compounded protein and was compounded from gp120mRNA here using Sf cell extract prepared by the pressurizing condition of 5, 8,

and 14 kgf/cm<sup>2</sup> is shown in drawing 4. In the cell extract prepared by the pressurizing condition of 5 – 14 kgf/cm<sup>2</sup> as shown in the lanes 2, 4, and 6 of drawing 4, It was shown that glycoprotein (drawing 4 is shown as the arrow 1) is compounded specifically, and good glycoprotein composition was especially detected from mRNA in the cell extract by the pressurizing condition of 8 and 14 kgf/cm<sup>2</sup>.

[0073](3) The influence cell number of nitrogen gas application-of-pressure time was set to a  $1.0 \times 10^8$  individual / ml, the nitrogen gas pressure was made into 8 kgf/cm<sup>2</sup>, and the nitrogen gas application-of-pressure time for preparing a cell extract was examined.

[0074]

[Table 3]

窒素ガスによる加圧時間の影響

翻訳能 (%)	加圧時間 (分)							
	3	5	10	15	30	60	90	120
翻訳能 (%)	25	40	56	63	76	100	100	46

As shown in Table 3, what is necessary is just to have been the application-of-pressure time more than for 3 minutes, and the application-of-pressure time for 30 to 60 minutes was especially preferred.

[0075](4) The speed which makes cell crushing liquid blow off from the inside of the influence mini cylinder of the spray velocity was examined in the 15–200ml/sec range. The spray velocity did not affect translation ability.

[0076][Example 3] The mRNA addition to the cell extract in the case of the optimum-ized translation reaction of the examination (1) mRNA concentration of a translation reaction condition was examined. To the above-mentioned Sf cell extract, gp120mRNA was added, respectively so that it might become concentration twice one by one from 3.125 microg/ml to 400 microg/ml, and translation ability and sugar chain ornamentation ability were measured. The result is shown in drawing 5. In drawing 5, GP120 by which GP120 to which the sugar chain does not attach the round mark is not added in the rhombus seal to the sugar chain is shown.

[0077]As shown in drawing 5, it was shown that generation of GP120 (sugar chain un-adding) can use translation ability efficiently highly in 200 microg/ml. On the other hand, when glycoprotein was 50 micro more than/g/ml, it showed the high, almost fixed value.

[0078](2) The temperature conditions of reaction temperature and the influence translation reaction time of reaction time were examined. To the cell extract, gp120mRNA was added so that it might become the 200 microg/ml last concentration, under the temperature of 15 \*\* – 45 \*\*, the reaction was made to perform for 30 and 60 or 90 minutes, and the generated amount of the translation product in that case was measured. Referred to as a cell number  $1.0 \times 10^8$  individual / ml here, nitrogen gas processing time was set up in 30 minutes, and used the cell extract which crushed the cell and was prepared.

[0079]What graph-ized the relative generated amount is shown in drawing 6. As shown in drawing 6, at the reaction temperature of 25 \*\*, it was guessed that translation and sugar chain ornamentation activity are shown, and the peak of activity exists around for reaction-time 60 minutes in sugar chain ornamentation activity especially, and a peak exists in the hit for 30 to 60 minutes in translational activity.

[0080]On the other hand, in 37 \*\*, as compared with 25 \*\*, translation and sugar chain ornamentation activity fell to the half grade, and both activity fell remarkably at 45 \*\*. In 15 \*\*, although both activity was low, about glycoprotein, the pattern in which a generated amount rises in proportion to time was shown.

[0081]The graph which compared the yield of GP120 by reaction temperature and reaction time similarly is shown in drawing 7 using the \*\*\*\* cell extract which performed cell crushing and prepared the cell of \*\*\*\* on the same conditions as the above-mentioned Sf cell. Also in \*\*\*\*, good translation and sugar chain ornamentation activity were shown by the reaction temperature of 25 \*\*.

[0082](2) The influence of the translation ability on [ at the time of adding various reagents to the influence cell extract of addition of a reagent etc. ] was investigated. Here, about magnesium acetate, potassium acetate, spermidine, GTP, ATP, and creatine kinase, it added by the concentration of the range respectively fixed to a cell extract, the generated amount of the protein from gp120mRNA or glycoprotein was quantified relatively, and translation ability and sugar chain ornamentation ability were examined.

[0083]The result of having examined magnesium acetate concentration is shown in drawing 8. In drawing 8, GP120 by which GP120 to which the sugar chain does not attach the round mark was added in the rhombus seal to the sugar chain is shown.

[0084]As shown in drawing 8, about magnesium acetate, good translational activity was shown in 1.5mM, and the good result was shown [ activity / sugar chain ornamentation ] in 2mM.

[0085]The result of having examined potassium acetate concentration is shown in drawing 9. About potassium acetate, it was shown in 100mM that translational activity and sugar chain ornamentation activity are high. In drawing 9, GP120 by which GP120 to which the sugar chain does not attach the round mark was added in the rhombus seal to the sugar chain is shown like drawing 8.

[0086]The result of having examined spermidine concentration is shown in drawing 10. About spermidine, it was shown in 0.25mM that a protein generated amount (\*\*\*\* addition) is the highest, and 0.25mM is preferred. In drawing 10 (also setting to drawing 11, and 12 and 13 hereafter the same), GP120 by which GP120 to which the

sugar chain does not attach the solid line was added into the dotted line to the sugar chain is shown.

[0087]The result of having examined GTP concentration is shown in drawing 11. About GTP, in 0.25mM, the protein generated amount (\*\*\*\* addition) was the highest, and it was shown that translation is efficiently performed in this density range. On the other hand, it was shown that generation of glycoprotein is not greatly influenced by GTP concentration.

[0088]The result of having examined ATP concentration is shown in drawing 12. About ATP, in 1 – 1.5mM, the protein generated amount (\*\*\*\* addition) was the highest, and it was shown that translation is efficiently performed in this density range. It was shown that generation of glycoprotein is not greatly influenced by ATP concentration on the other hand although a little high value is shown in 0.5.

[0089]The result of having examined creatine kinase concentration is shown in drawing 13 (a) and (b). As shown in drawing 13 (a) and (b), the result in 400 microg/ml with the best translational activity was shown through two experiments. On the other hand, about sugar chain ornamentation activity, the good result was shown more than in 400 microg/ml.

[0090]These results were synthesized, the cell extract was prepared to the following presentation in the example shown below, and the translation reaction was performed at 25 \*\*.

[0091]

insect cell extract A260=30.4 HEPES-KOH (pH 7.95) final concentration 10.6mM magnesium acetate Final concentration 1.3mM potassium acetate Final concentration 100mMDTT final concentration 2.5mM spermidine Final concentration 0.25mM creatine kinase . 444 microg/ml final concentration phosphoric acid creatine Final concentration 8.0mMATP final concentration 1.2mMGTP final concentration 0.25mM amino acid mixture 200 microg/ml final concentration MmRNA final concentration [Example 4] of 25micro The identification HIV patient antiserum of the translation product using an insect cell extract. Translation product GP120 compounded by used Western blotting using the above-mentioned insect cell extract was analyzed. An analysis result is shown in drawing 14 and drawing 15.

[0092]GP120 was detected by the position which is equivalent to 90kDa and 56kDa on SDS-PAGE as shown in drawing 14 (lanes 2 and 3). On the other hand, GR120 revealed by Sf21 cell by the Baculoviridae insect cell system is glycoprotein, and is detected as a band very strong against the position of 90kDa (lanes 5 and 6). This suggests a possibility that the sugar chain is added to the translation product compounded using Sf cell extract.

[0093]In the cell extract of the control prepared from rabbit reticulocyte and a wheat germ on the other hand, As for the obtained translation product, the band was strongly detected in the position of 56kDa (drawing 15, lanes 4 and 6), and the band which is equivalent to the position of 90kDa like the translation product compounded using the insect cell extract (lane 2) was not detected. A possibility that posttranslational modification, such as sugar chain addition, was performed only in GP120 by which this was compounded by the insect cell extract was suggested strongly.

[0094][Example 5] In order that translation product GP120 compounded by the desugaring chain example 4 of the translation reaction product by a translation reaction using Sf21 cell extract might check that it is the glycoprotein by which sugar chain ornamentation was carried out, sucroclastic enzyme was used and translation product GP120 was processed. Here, N type sugar chain dialytic ferments, such as N-glycosidaseF, endoglycosidaseF, or endoglycosidaseH, were used as sucroclastic enzyme. The result of a decomposition reaction is shown in drawing 16.

[0095]As shown in drawing 16, as a result of processing GP120 with the above-mentioned N type sucroclastic enzyme, the band of 90kDa which exists in an unprocessed fraction disappeared, it changed to it, and the band of new protein was detected with the unprocessed sample by the position (position shown by an arrow) which is not accepted. This showed that it was the band shift produced with the desugaring chain, and suggested strongly that the N type sugar chain was added to translation reaction product GP120. Although similarly processed by O-glycosidase, addition of O type sugar chain was not accepted (not shown).

[0096]It was examined by other methods whether a translation product would have a sugar chain. You presented the lectin sepharose column with the GP120 above-mentioned protein, you made it eluted by methyl-alpha-D-MANNO pyranoside, and fractionation was performed. And Western blotting was performed for the bypassing fraction obtained here and the eluate fraction by methyl-alpha-D-MANNO pyranoside using HIV patient antiserum. As a result, the band of gp120 was detected by the position which is equivalent only to the eluate fraction by methyl-alpha-D-MANNO pyranoside at the above-mentioned 90kDa (not shown). Also from this, translation product GP120 suggested strongly that it was glycoprotein which has a sugar chain.

[0097][Example 6] It was investigated whether translation and sugar chain ornamentation would be performed by preparing different mRNA from the above-mentioned example about control arrays, such as the glycoprotein composition analysis UTR using various mRNA(s), and a signal sequence, and the coding sequence which encoded the protein by which sugar chain ornamentation may be carried out. The thing of the Pori Hedrin origin of a baculovirus and bovine growth hormone (BGH) origin was used for UTR used here. As a signal sequence, the interleukin 6 (IL6) origin (array number 5) and the fowl lysozyme (cL) origin (array number 4) were used. The interleukin 6 (IL6) coding sequence was used for the coding sequence in common. These were built as an expression plasmid using pUC18 like Example 1, generated mRNA using this, and investigated the following translations and sugar chain ornamentation activity. The list of the result is shown in Table 4.

[0098]  
[Table 4]

			翻訳／糖付加	昆虫	紫蚕	ウサギ	小麦胚芽
1	BMV タンパク2a	翻訳	+	+	++	+	+
2	タンパク2a	翻訳	±	±	++	++	++
3	外被タンパク	翻訳	+	+	±	++	++
4	SF162 gp120	翻訳 糖付加	+	+	+	+	+
+	+						
発現系	5'-UTR	シグナル	コード・タンパク	3'-UTR			
5 ppILIL6p	ボリヘトリ	IL 6	IL 6	ボリヘトリ	翻訳	- ND	- ND
6 ppCIL6p	ボリヘトリ	c L <sup>a)</sup>	IL 6	ボリヘトリ	翻訳 糖鎖付加	++ +	+ ND
7 pp(-)IL6p	ボリヘトリ	なし	IL 6	ボリヘトリ	翻訳	++ +	+ ND
8 pBILIL6B	B GH <sup>b)</sup>	IL 6	IL 6	B GH	翻訳	- ND	- ND
9 pBCIL6B	B GH	c L	IL 6	B GH	翻訳	- ND	± ND
10 pB(-)IL6B	B GH	なし	IL 6	B GH	翻訳	- ND	± ND
11 ppCIL6B	ボリヘトリ	c L	IL 6	B GH	翻訳 糖鎖付加	+ ND +	ND ND
12 pBCIL6p	B GH	c L	IL 6	ボリヘトリ	翻訳	- ND	- ND

a) c L : chicken lysozyme

b) B GH : bovine growth hormone

c) ND : not determined

Although translation and sugar chain ornamentation activity were checked in the extract of an insect Sf cell and \*\*\*\* origin in the analysis using mRNA of SF162gp120 shown in Example 1, In the rabbit reticulocyte of control, and the cell extract of wheat germ origin, although translational activity was accepted, sugar chain ornamentation activity was not detected like the insect cell.

[0099]When the arrangement of cL origin was used for 5'UTR for 5'UTR of the Pori Hedrin origin as a signal sequence in (the 5-12th columns) and an insect cell extract from the analysis using mRNA from which a control array differs variously, it was shown that translation and sugar chain ornamentation are performed (the 6th and 11 column). Sugar chain ornamentation was performed regardless of whether 3'UTR is of the Pori Hedrin origin, or it is of bovine growth hormone origin.

[0100]On the other hand, in the insect cell extract, when the thing of BGH origin was used for 5'UTR, and when IL6 signal was used as a signal sequence, only translation was performed and sugar chain ornamentation was not performed. From this, it was shown that 5'UTR and a signal sequence are important for execution of sugar chain ornamentation.

[0101]In the rabbit reticulocyte of control, and the cell extract of wheat germ origin, sugar chain ornamentation was not observed at all by used mRNA.

[0102][Example 7] In the cell extract of an examination mammalian cell using a CHO cell, it was examined like the above-mentioned insect cell whether it would have translation and sugar chain ornamentation activity. Here, the CHO cell extract was prepared by the same method as the preparation conditions of the cell extract of the above-mentioned insect cell, using a CHO cell as a mammalian cell. Three sorts of mRNA(s) were prepared in analyses, such as translation ability of the cell extract of this CHO cell. As these mRNA(s) are shown in the following table 5 (1) gp120 (HIV-1SF162 origin) coding sequence, Pori Hedrin UTR, the first mRNA that has gp120 signal sequence, (2) They are UTR of expression vector pRc/CMV for IL6 coding sequence, Pori Hedrin UTR, the second mRNA provided with cL signal sequence, (3) IL6 coding sequence, and mammals, and the third mRNA provided with the signal sequence of IL6.

[0103]The translational activity of a CHO cell extract and sugar chain ornamentation activity were investigated using these three sorts of mRNA(s). The result is shown in Table 5. The result in the cell extract of an insect cell (Sf cell) by which translation and sugar chain ornamentation activity were checked is similarly shown as positive control.

[0104]

[Table 5]

細胞抽出液	培型	録型タイプ	UTR	シグナル配列	翻訳	糖鎖付加
昆虫細胞	HIV-1 SF162 のgp120	バキュロウイルス(昆虫)	ポリヘドリン	HIV-1 SF162 のgp120	+++	+++
	ヒト型インターロイキン6	CHO細胞(哺乳類)	ポリヘドリン	ニワトリリゾーム	+++	+++
			哺乳類用発現ベクターpRc/CMVのUTR	ヒト型インターロイキン6	++	++
CHO細胞	HIV-1 SF162 のgp120	バキュロウイルス(昆虫)	ポリヘドリン	HIV-1 SF162 のgp120	++	-
	ヒト型インターロイキン6	CHO細胞(哺乳類)	ポリヘドリン	ニワトリリゾーム	++	-
			哺乳類用発現ベクターpRc/CMVのUTR	ヒト型インターロイキン6	+++	-

+:合成した -:合成しない

As shown in Table 5, in the CHO cell extract, translational activity was detected also in which mRNA, but sugar chain ornamentation activity was not able to be checked. Thus, by the cell extract of the CHO cell, although sugar chain ornamentation activity was not able to be checked, on the other hand, it was shown that the cell crushing method by change of the above-mentioned gas pressure can collect from a mammalian cell at least the cell extracts which have translational activity.

[0105]When translation ability was compared and UTR of pRc/CMV was used, it was shown that translation ability is going up. It was shown that it is important for improvement in translation ability to make the kind of cell which prepared the cell, and the cell strain in which UTR originates correspond as for this.

[0106]On the other hand, in the insect cell extract used as positive control, translational activity and sugar chain ornamentation activity were checked also in which mRNA. When Pori Hedrin UTR was used especially, raising translational activity and sugar chain ornamentation activity was shown. From this, it has infection ability into the cell which prepared the cell extract, and it was shown that UTR of the living thing origin which can be grown can be suitably used as a control array for making the translation and sugar chain ornamentation which used the cell extract perform.

[0107][Example 8] Although translational activity was detected, by a CHO cell extract, it was not able to detect about sugar chain ornamentation activity, as [ of a CHO cell extract and an insect cell (Sf cell) extract ] mixture composition liquid \*\*\*\* was carried out. Since it supplemented with this sugar chain ornamentation activity, the presentation liquid which mixed the CHO cell extract and the insect cell extract with the various mixing ratio was prepared, and this presentation liquid examined translational activity and sugar chain ornamentation activity.

[0108]Specifically, mRNA used IL6mRNA (mRNA from ppILIL6p in Example 6, ppILIL6B, or ppCLIL6B) provided with the signal sequence which originates [ IL6 ] or originates [ fowl lysozyme (cL) ] in the above-mentioned examination. These mRNA(s) were added in each presentation liquid, fractionation of a part of this presentation liquid was carried out by electrophoresis, and waste-cloth TAMBURO Tyng using anti-IL6 antibody compared identification of IL6 protein, and the generated amount of \*\*\*\* after fractionation. The result of Western blotting is shown in drawing 17, and the value which turned a fixed quantity of band strength with the densitometer is shown in Table 6.

[0109]

[Table 6]

## A) IL6 本来のシグナル配列使用

CHO細胞抽出液	10	9.9	9	5	0
昆虫細胞抽出液	0	0.1	1	5	10
pre-IL6	66	65	57	85	100
糖鎖付加IL6	0	0	4	43	95
シグナル切除されたIL6	0	0	3	6	33

## B) IL6 のシグナル配列をニワトリリゾームのシグナル配列で置換した

CHO細胞抽出液	10	9.9	9	1	0
昆虫細胞抽出液	0	0.1	1	9	10
pre-IL6	26	29	23	31	48
糖鎖付加IL6	0	2	11	61	100
シグナル切除されたIL6	0	0	2	13	32

As shown in drawing 17 and Table 6, IL6 protein was detected in CHO-insect (9.9:0.1) presentation liquid, but IL6 protein by which sugar chain ornamentation was carried out was not detected, but not being supplemented with sugar chain ornamentation activity was shown.

[0110]On the other hand, with CHO-insect (9:1) presentation liquid and CHO-insect (5:5) presentation liquid, the band was detected by the position corresponding to IL6 protein band in which the sugar chain which is detected in the insect cell extract independent case of control was added, and it was shown that sugar chain ornamentation is performed.

[0111]As mentioned above, even if it is a cell extract which has only translational activity, it becomes possible to supplement with sugar chain ornamentation activity by mixing the cell extract which has other sugar chain ornamentation ability. Although this result is preparing the cell extract of a CHO cell on conditions [\*\*\*\*] by change of gas pressure, it is under [ this cell extract ] setting. Although one which bears the sugar chain ornamentation activity which a cell originally has of factors runs short and sugar chain ornamentation activity is not done so, this factor is compensated by the insect cell extract and a possibility of being supplemented with sugar chain ornamentation activity is suggested.

[0112][Example 9] It was shown by the presentation liquid containing the extract of an insect cell and this which showed the example which carried out application \*\*\*\* that translation and sugar chain ornamentation, and also processing can also be performed by in vitro one. The control array which may raise the efficiency of this sugar chain ornamentation was also become clear. By package-izing the expression vector provided with such a cell extract and control array, an in vitro glycoprotein composition kit can be constituted and it becomes possible to make glycoprotein and the protein by which processing was carried out compound by in vitro one simple.

[0113]In the above-mentioned CHO-insect presentation liquid, since processing was also made to perform, it is expected that this presentation liquid will serve also as a model system for analyzing processing of the protein after translation. That is, it was suggested by performing cell crushing under the mild conditions using inactive gas that cell-free extracts were collected where the membrane which participates in sugar chain ornamentation etc. is saved. Therefore, this cell extract can serve also as a model system at the time of analyzing what processing etc. are carried out after it being not only useful, but [ when compounding glycoprotein etc., ] the protein (or precursor) compounded by translation translating.

[0114]

[Layout Table]

array number: -- length [ of 1 arrangement ]: -- mold [ of 52 arrangement ]: -- number [ of nucleic acid chains ]: -- double strand topology: -- kind [ of straight-chain-shape arrangement ]: -- the genomic DNA origin living thing name: -- the feature of baculovirus arrangement sign: which shows the feature -- 5'UTR arrangement GGGAGTATT TACTGTTTC. GTAACAGTTT TGTAATAAAA AACCTATAA AT 52 array number: -- length [ of 2 arrangement ]: -- mold [ of 379 arrangement ]: -- number [ of nucleic acid chains ]: -- double strand topology: -- kind [ of straight-chain-shape arrangement ]: -- the genomic DNA origin living thing name: -- the feature of baculovirus arrangement The feature. The shown sign: 3'UTR arrangement AACACGATAC ATTGTTATTA GTACATTAT. TAAGCGCTAG ATTCTGTGCG. TTGTTGATT 60ACAGACAATT. GTTGTACGTA TTTTATAAT. TCATTAATTATAATCTTT. AGGGTGGTAT 120GTTAGAGCGA. AAATCAAATG ATTTTCAGCG TCTTTATATC

TGAATTTAAA TATTAATCC 180 TCAATAGATT TGTAATAG GTTTCGATTA GTTTCAAACA AGGGTTGTTT TTCCGA. ACCG 240 ATGGCTGGAC TATCTAATGG ATTTTCGCTC AACGCCACAA AACTTGCCAA ATCTTGTAGC 300 AGCAATCTAG CTTTGTGAT ATTCGTTTGT. GTTTTGTGTTT GTAATAAAGG. TTGACGTCG 360TTCAAAATAT. TATGCTGCA. 379 array numbers : The length of 3 arrangement : mold [ of 21 arrangement ]: -- number [ of nucleic acid chains ]: -- double strand topology: -- nucleic acid besides kind: of straight-chain-shape arrangement synthetic DNA arrangement TAATACGACT CACTATAGGG A 21 array number: -- length [ of 4 arrangement ]: -- mold [ of 54 arrangement ]: -- number [ of nucleic acid chains ]: -- double strand topology: -- nucleic acid besides kind: of straight-chain-shape arrangement . Synthetic DNA arrangement ATG AGG TCT TTG CTA ATC TTG GTG CTT TGC TTC CTG CCC CTG GCT GCT CTG 51Met Arg Ser Leu Leu Ile Leu Val Leu Cys Phe Leu Pro Leu Ala Ala Leu 5 10 15GGG 54Gly 18 array number: -- length [ of 5 arrangement ]: -- mold [ of 84 arrangement ]: -- number [ of nucleic acid chains ]: -- double strand topology. : nucleic acid besides kind: of straight-chain-shape arrangement . Synthetic DNA arrangement ATG AAC TCC TTC TCC ACA AGC GCC TTC GGT CCA GTT GCC TTC TCC CTG GGG 51Met Asn Ser Phe Ser Thr Ser Ala Phe Gly Pro Val Ala Phe Ser Leu. Gly 5 10 15CTG CTC CTG GTG TTG CCT GCT GCC TTC CCT GCC 84Leu Leu Leu Val Leu Pro Ala Ala Phe Pro Ala 20 25[0115]

[Effect of the Invention]As above, preparation of a new cell extract was provided by this invention, and it enabled this to collect from a cell the cell-free extracts which have translation and sugar ornamentation ability simple. It becomes possible by using the cell-free extract of this invention to add the sugar chain of the request which exists in living world, for example to recombination object protein.

---

[Translation done.]

## \* NOTICES \*

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

## DESCRIPTION OF DRAWINGS

---

### [Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1]It is a lineblock diagram of the translation device in this embodiment.

[Drawing 2]It is a figure showing the constructing method of the mRNA expression vector in Example 1.

[Drawing 3]It is a lineblock diagram of mRNA revealed by the expression vector in Example 1.

[Drawing 4]It is a figure about the result of having examined the gas pressure conditions at the time of cell extract preparation in Example 4.

[Drawing 5]It is a figure showing the result of having examined the mRNA addition in Example 4.

[Drawing 6]It is a figure showing the result of having examined the suitable translation reaction time in Example 4.

[Drawing 7]It is a figure showing the result of having examined the suitable translation reaction temperature in Example 4.

[Drawing 8]It is a figure showing the result of having examined the magnesium acetate concentration in Example 4.

[Drawing 9]It is a figure showing the result of having examined the potassium acetate concentration in Example 4.

[Drawing 10]It is a figure showing the result of having examined the spermidine concentration in Example 4.

[Drawing 11]It is a figure showing the result of having examined the GTP concentration in Example 4.

[Drawing 12]It is a figure showing the result of having examined the ATP concentration in Example 4.

[Drawing 13]It is a figure showing the result of having examined the creatine kinase concentration in Example 4.

[Drawing 14]It is a figure showing the result of having identified the translation product using the insect cell extract in Example 4 by Western blotting.

[Drawing 15]It is a figure at the time of Western blotting detecting the insect cell in Example 4, rabbit reticulocyte, and the translation product by the cell extract of a wheat germ.

[Drawing 16]It is a figure showing the result to which desugaring chain processing of the translation reaction product by the insect cell extract in Example 5 was carried out.

[Drawing 17]It is a figure showing the result of Western blotting at the time of analyzing translation of the CHO-insect presentation liquid in Example 8, and sugar chain ornamentation activity.

[Description of Notations]

10 A translation device and 12 [ Control section. ] An extract preparation part and 14 A translating part, 16 inactive-gas feed zone, and 18 An outlet and 20

---

[Translation done.]

**\* NOTICES \***

JPO and INPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

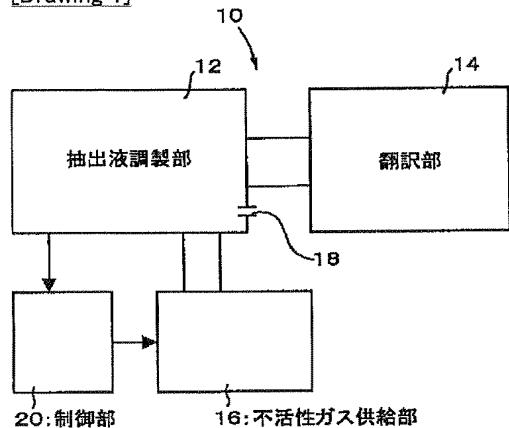
1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

## DRAWINGS

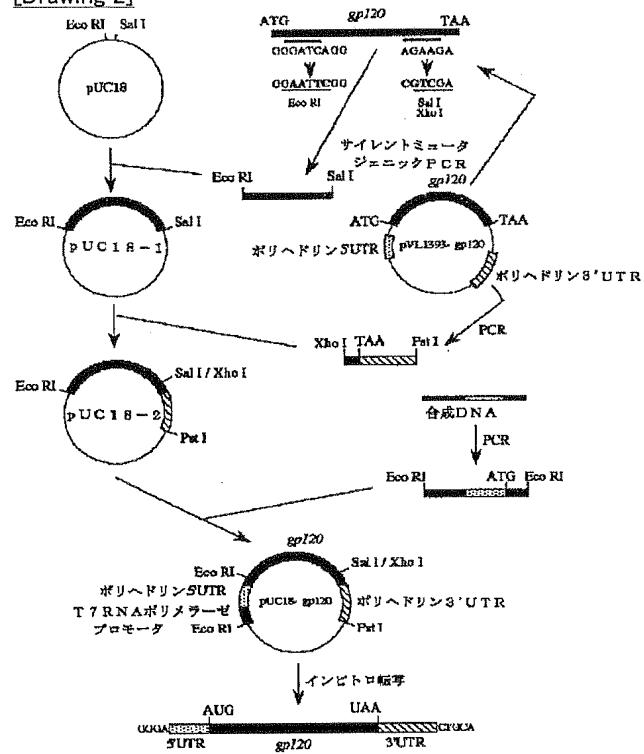
[Drawing 3]

GGGA [ ] AUG UAA [ ] CTGCA  
 ポリヘドリンS' - UTR gp120 ポリヘドリンS' - UTR  
 52base 1509 base 379base

### [Drawing 1]

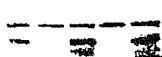


[Drawing 2]



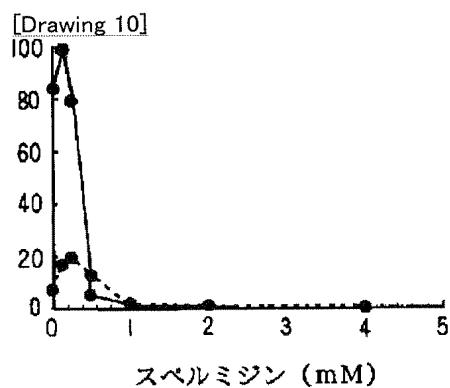
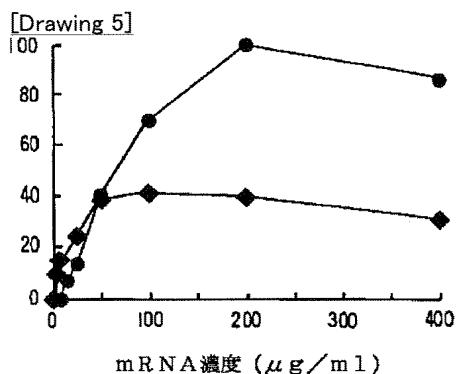
[Drawing 4]

	G P 1 2 0					
mRNA	-	+	-	+	-	+
ガス圧 (kg/cm <sup>2</sup> )	5		8		14	
レーン#	1	2	3	4	5	6

①→ 

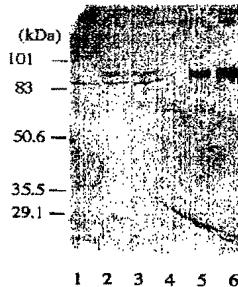
②→ 

① 糖鎖付加した G P 1 2 0  
② 糖鎖がつかない G P 1 2 0

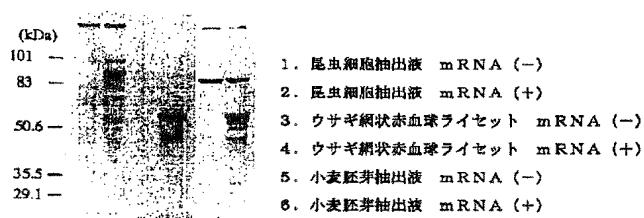


[Drawing 14]  
無細胞系翻訳 (-)

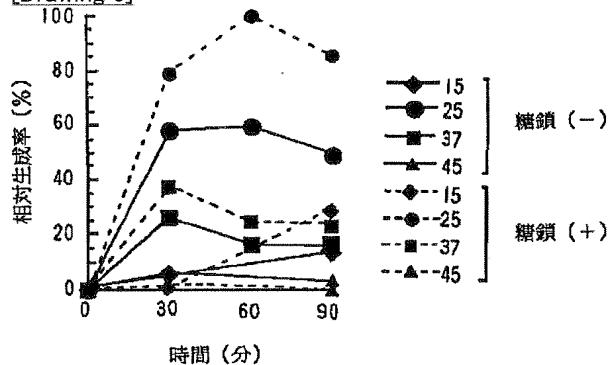
mRNA - + + (-) Sf21 cells 内で発現



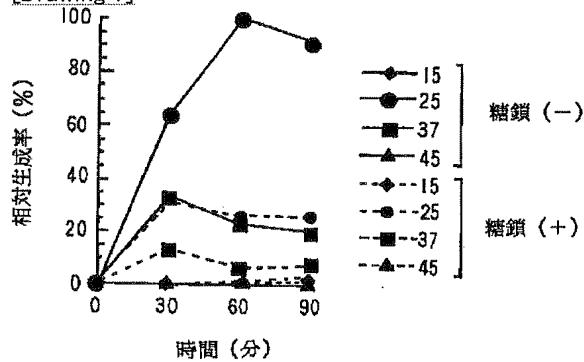
[Drawing 15]



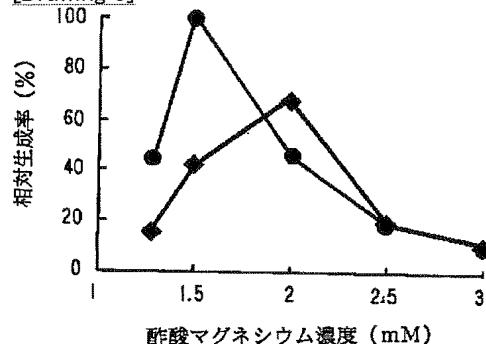
[Drawing 6]



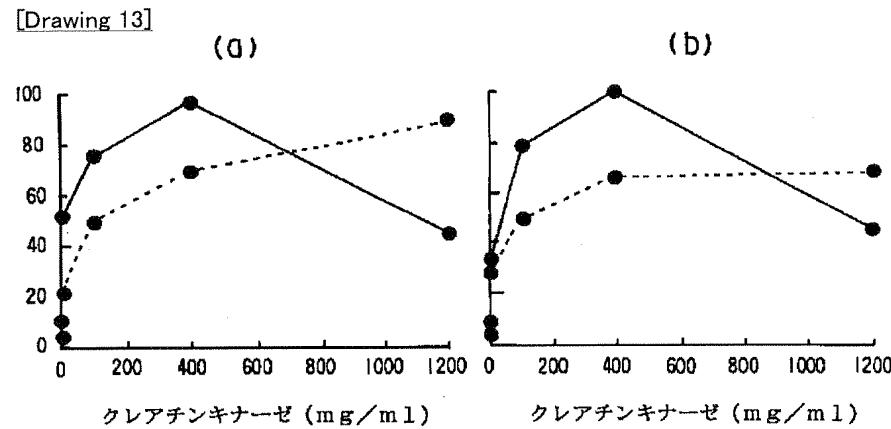
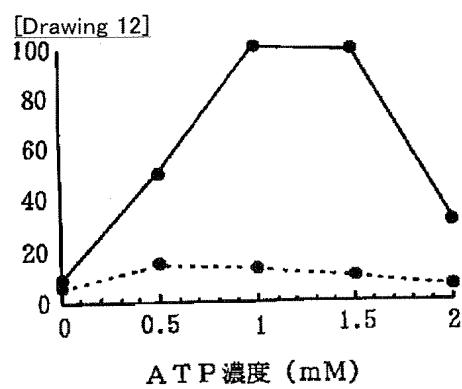
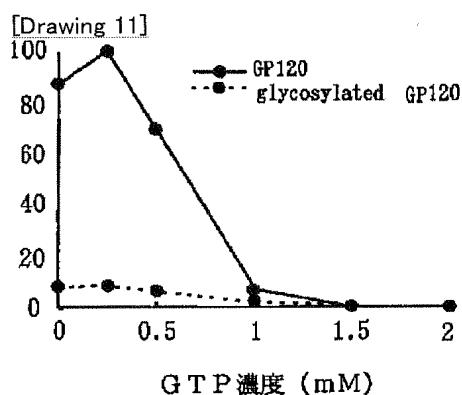
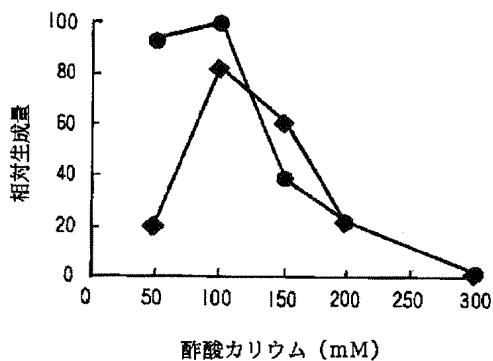
[Drawing 7]

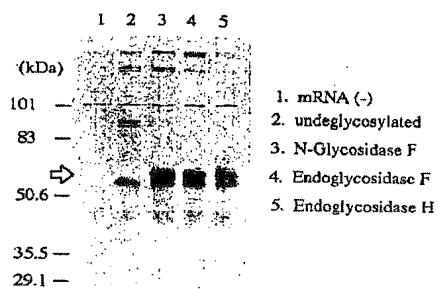


[Drawing 8]



[Drawing 9]





[Drawing 17]

CHO 抽出液	9	9.9	9.9	0	9	9	0	5	5	0	10	0
昆虫抽出液	1	0	0.1	0.1	0	1	1	0	5	5	0	10
バッファ	0	0.1	0	9.9	1	0	9	5	0	5	0	0

A

IL6-NS S  
(天然シグナル配列  
を有するIL6mRNA)

ブレーIL6  
結合IL6  
プロセスIL6

B

IL6-CLSS  
(cLシグナル配列  
を有するIL6mRNA)

結合IL6  
ブレーIL6  
プロセスIL6

[Translation done.]